Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität mit o-Nitrophenylbutyrat; Untersuchungen zur Leistungsfähigkeit der Methode

von

Inge Kaiser

aus Hannover

1964

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

BESTIMMUNG DER CHOLINESTERASE-AKTIVITÄT MIT o-NITROPHENYL-BUTYRAT; UNTERSUCHUNGEN ZUR LEISTUNGSFÄHIGKEIT DER METHODE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Inge Kaiser
aus Hannover

Erlangen 1964

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. W.-D. Keidel
Referent: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 1964

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A) Die Cholinesterasen	5
B) Cholinesterase-Aktivität im Blutserum	5
I. Unveränderte Cholinesterase-Aktivität	5
1. Normalwerte	5
2. Atypische Esterasen	6
II. Veränderte Cholinesterase-Aktivität	7
1. Erhöhte Cholinesterase-Werte	7
2. Erniedrigte Cholinesterase-Werte	8
a) Durch Krankheiten	8
b) Hemmung durch Präparate	10
c) Vergiftung mit Alkylphosphaten	10
III. Untersuchung zwischen Vergiftungen und anderen Ursachen einer geringen Cholinesteraseaktivität durch Reaktivierung mit PAM (Pyridin-Aldoxim-Methjodid)	11
C) Methoden zur Bestimmung der Serum-Cholinesterase-Aktivität	13
I. Bestimmung des nicht umgesetzten Substrates	13
II. Bestimmung der Spaltstücke	18
1. Säurekomponente	18
a) Gasanalytische Methoden	18
b) Elektrometrische Methoden	19
c) Colorimetrische Methoden	24
2. Alkoholkomponente	27
a) Verschiedene Methoden	27
b) Die Methode von Main, Miles und Braid zur Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität (41) mit o-Nitrophenylbutyrat	27

c) Reagentien 28
d) Arbeitsgang 30
e) Bestimmung der Enzymaktivität 31
f) Eichkurve 33
D) Problemstellung: Untersuchungen zur Leistungsfähigkeit der Methode von Main, Miles und Braid 36
I. Eigene Cholinesterase-Aktivitätsbestimmungen in menschlichem Blutserum 36
1. Aktivität in Nativ-Seren (1. Tag) 36
2. Aktivität in Nativ-Seren, bis 4 Wochen nach Blutentnahme 38
II. Cholinesterase-Aktivität bei Zusatz von Anticoagulantien 43
1. Die gerinnungshemmenden Substanzen 43
2. Plasma-Untersuchungen, bis 4 Wochen nach Blutentnahme, mit Anticoagulans-Zusatz 44
3. Ergebnisse 55
a) Graphische Darstellung der positiven und negativen Abweichungen vom Nativwert 55
b) Aufgliederung nach den gerinnungshemmenden Zusätzen 66
c) Aufgliederung nach den einzelnen Untersuchungstagen 68
III. Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität nach Hemmung mit einem Alkylphosphat. Versuche mit Isosystox-Sulfoxyd 72
IV. Reaktivierungsversuch mit PAM (Pyridin-Aldoxim-Methjodid) 73
E) Diskussion 82
F) Zusammenfassung 85
G) Literaturverzeichnis 87

BESTIMMUNG DER CHOLINESTERASE-AKTIVITÄT MIT o-NITROPHENYLBUTYRAT; UNTERSUCHUNGEN ZUR LEISTUNGSFÄHIGKEIT DER METHODE.

A) Die Cholinesterasen

Die Cholinesterasen gehören zu den körpereigenen Fermenten. Das menschliche Blut enthält in den Erythrocyten die Acetylcholinesterase, im Serum die Pseudo- oder Plasmacholinesterase, die auch unspezifische Cholinesterase, Butyryl- oder Typ-II Cholinesterase genannt wird. Es gilt als sicher, daß diese Pseudo-Cholinesterase in den Parenchymzellen der Leber gebildet und in das Plasma sezerniert wird.

Beide Cholinesterasen hydrolysieren zum Beispiel Acetylcholin zu Essigsäure und Cholin:

$$CH_3COOCH_2CH_2N^+(CH_3)_3 + H_2O \xrightarrow{CHE} CH_3COOH + HOCH_2CH_2N(CH_3)_3.$$

Diese Eigenschaft bildet die Grundlage für die verschiedenen chemischen Bestimmungsmethoden. Bei Verwendung von Acetylcholin oder diesem verwandten Substraten kann die in Freiheit gesetzte Säure, der abgespaltene Alkohol-Anteil oder die Menge an nicht hydrolysiertem Substrat bestimmt werden.

B) Cholinesterase-Aktivität im Blutserum

I. Unveränderte Cholinesterase-Aktivität

1. Normalwerte:

Gesunde, normal ernährte Personen besitzen einen recht

konstanten Serumcholinesterase-Spiegel. Es gibt keine wesentlichen Schwankungen in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht, Tages- und Jahreszeiten, jedoch bedeutende Abweichungen der Werte zwischen den verschiedenen Einzelpersonen.

Schon früher hatten zahlreiche Autoren darauf hingewiesen, daß die vegetative Einstellung des menschlichen Organismus aus der Aktivität der Cholinesterasen, vor allem der Serumcholinesterase, zu erkennen sei. Heinecker und Losse (24) führten 1955 gleichzeitig Kreislauf-, Gasstoffwechsel- und Blutanalysen durch. Sie kamen dabei zu dem Ergebnis, daß die durch ein hohes Minutenvolumen und einen nohen Sauerstoffverbrauch, eine relativ niedrige Eosinophilen- und Lymphocytenzahl sowie niedrigen K/Ca-Quotienten gekennzeichneten Sympathikotoniker überwiegend eine erhöhte Serumcholinesterase-Aktivität aufweisen. Die Parasympathikotoniker verhalten sich gegensinnig und besitzen einen erniedrigten Cholinesterase-Spiegel.

2. Atypische Esterasen:

Bei Personen mit verlängerter Succinylcholin-Wirkung während einer Narkose untersuchte als einer der ersten Kalow (30) die Serumcholinesterasen. Er fand, daß diese Personen nicht nur quantitativ weniger Cholinesterasen im Serum besaßen als der Norm entsprach, sondern daß sich diese Cholinesterasen auch qualitativ von der Cholinesterase der meisten Menschen unterscheidet.

Weitere Familienuntersuchungen zeigten, daß diese Phänotypen-Gruppen durch ein einfaches Zwei-Gene-System determiniert werden. Personen mit noher Cholinesterase-Aktivität haben zwei Gene für typische Esterase, solche mit

einer erniedrigten Cholinesterase-Aktivität besitzen zwei Gene für atypische Esterase und Individuen mit einer intermediären Aktivität sind heterozygot, besitzen also ein Gen für typische und ein Gen für atypische Esterase.

Lidell, Lehmann und Silk (1962) (35) sowie Woolf (1962) (68) beschrieben sogar Fälle von erblich bedingter Cholinesterase-Aktivität von praktisch Null (silent gene).

II. Veränderte Cholinesterase-Aktivität

1. Erhöhte Cholinesterase-Werte:

Außer bei den oben genannten Sympathikotonikern gibt es noch andere Fälle von erhöhtem Serum-Cholinesterase-Spiegel. Wie Faber (11) forderte, ist wirklich bei vermehrter Albuminsynthese in der Regel die Cholinesterase-Aktivität erhöht. Wie schon andere Autoren fanden Maier (40), Stefenelli (58) und Lang und Intsesuloglu (34) übereinstimmend auch bei dem nephrotischen Syndrom mit seiner Proteinurie erhöhte Werte. Man nimmt an, daß die hochgradig gesteigerte Regeneration der Albumine auch eine vermehrte Cholinesterasebildung zur Folge hat. Die Cholinesterase wird aber unter den Bedingungen, die zum Albuminverlust führen, ihrer unterschiedlichen molekularen Eigenschaften wegen nicht verloren. Bei einem Patienten mit Haemochromatose fanden Kommerell und Frenken (33) einen auffallend hohen Wert der Serum-Cholinesterase-Aktivität. Lang und Intsesuloglu (34) teilten 1962 erstmals zwei Fälle von Hyperlipaemie mit pathologisch erhöhten Cholinesterase-Werten mit.

2. Erniedrigte Cholinesterase-Werte:

a) Durch Krankheiten

Zu einer verminderten Bildung von Cholinesterasen kommt es bei Erkrankungen des Leberparenchyms. Das ist nicht verwunderlich, da als sicher angenommen werden kann, daß die Cholinesterasen, ebenso wie die Albumine des Serums, in der Leber gebildet werden. Beide Eiweißkörper haben jedoch nicht nur einen gemeinsamen Entstehungsort; auch ihre Synthesen selbst scheinen eng miteinander verbunden zu sein (Stefenelli (58)). Bei diffuser und anhaltender Leberschädigung sind beide Eiweißkörper im Serum vermindert. Von Faber (10) stammen die ersten Kenntnisse über eine Parallelität zwischen dem Gehalt des Serums an Albuminen und an Cholinesterase.

Nach Lang und Intsesuloglu (34) sind die Cholinesterase-Werte bei folgenden Krankheiten erniedrigt:

Bei akuter Hepatitis epidemica fanden die Autoren zu 85 % schon in den ersten Tagen des ikterischen Stadiums eine verminderte Aktivität. Der Ikterus dauerte umso länger an, je geringer die Anfangswerte der Cholinesterase-Aktivität waren.

Weitgehend analoge Befunde ergaben sich bei der Lebercirrhose. Meist zeigten sich sehr niedrige Werte, die bei schweren, dekompensierten Fällen mit Ascites noch einmal vermindert waren.

Auch bei Cholecystitis und Cholangitis zeigten sich erniedrigte Werte, die einer meist nachweisbaren infektiös-

toxischen Leberparenchymschädigung entsprachen.

Bei reinen Cholecystopathien und der Cholelithiasis ohne klinische Entzündungserscheinungen war die Aktivität normal. Ebenso fanden sich beim Verschlußikterus meist normale Werte.

Die auffallend niedrigen Werte der Cholinesterase-Aktivität bei Gallenwegscarcinomen führen die Verff. weniger auf eine Störung der Leberfunktion, als auf eine Hypalbuminaemie zurück.

Die oft erniedrigten bis stark erniedrigten Werte bei Lymphogranulomatosen, Myelosen und Plasmocytomen sollen einen wertvollen Hinweis auf das Stadium der Erkrankung geben.

Herzinsuffizienz mit Leberstauung geht selten mit normaler, zum Teil jedoch mit stark erniedrigter Aktivität einher. Pietschmann (46) führt dies in erster Linie auf eine Mangelernährung (Stauungsgastritis) der Herzkranken zurück.

Maier (40) gab 1956 noch folgendes an: bei der akuten Leberdystrophie ist die Cholinesterase-Aktivität des Serums stark erniedrigt, bei der Fettleber ist sie normal, bei der Metastasenleber mehr oder weniger erniedrigt.

Bei Hypoproteinaemie und bei Polyarthritis sind die Aktivitätswerte erniedrigt.

Auch während der Schwangerschaft soll die Aktivität

der Cholinesterasen vermindert sein (Lang und Intsesuloglu (34)).

b) Hemmung durch Präparate

Auch durch zahlreiche Pharmaka werden die Cholinesterasen mehr oder weniger stark gehemmt: Physostigmin, Prostigmin, Farbstoffe, Vitamine (Vit. B 1), Hormone (Cortison und andere Glucocorticoide), Lysergsäurederivate, Alkylphosphate und -thiophosphate, Narcotica und Hypnotica, Histamin, Antihistaminica, Morphin, Chinin, Novocain, Stickstofflost, Natriumsalicylat, Muskelrelaxantien und Phenothiazine (Friedberg und Sakai (14), Augustinsson (3)).

c) Vergiftung mit Alkylphosphaten

Schädlingsbekämpfungsmittel aus der Gruppe der organischen Phosphorsäureester blockieren die Aktivität der Cholinesterasen. Man geht von der Vorstellung aus (14), daß die Cholinesterasen zwei aktive Stellen besitzen, eine anionische und eine esteratische. An der anionischen Stelle werden normalerweise die Cholinester angelagert, um an der esteratischen Stelle unter Acetylierung des Fermentes gespalten zu werden. Der Acetatrest löst sich dann sofort von der esteratischen Stelle, das Ferment ist wieder reaktionsfähig. - Die organischen Phosphorsäureester werden in entsprechender Weise abgebaut; der Alkylphosphatrest bleibt aber an der esteratischen Stelle gebunden und damit ist das Ferment blockiert.

Ein Teil der Phosphorsäureester hemmt die Cholinesterase in vivo, aber auch in der Leiche und in vitro, mehr oder

weniger reversibel (14).

Im Gegensatz zu anderen Fermenten überdauern die Cholinesterasen den Tod eines Organismus überraschend lange. So konnte Pribilla (49) in der Leiche noch nach 4 Wochen fast normale Cholinesterase-Aktivitäten ermitteln.

III. Unterscheidung zwischen Vergiftungen und anderen Ursachen einer geringen Cholinesterase-Aktivität durch Reaktivierung mit PAM (Pyridin-Aldoxim-Methjodid)

Aus dem bisher Mitgeteilten geht hervor, daß bei weitem nicht nur Vergiftungen mit organischen Phosphorsäureestern die Cholinesterase-Aktivität ändern. Für den Gerichtsmediziner ist es aber von großer Bedeutung, eine akute oder chronische, letale oder subletale Vergiftung mit einiger Sicherheit annehmen oder verneinen zu können. Sehr häufig ist eine Anamnese nicht bekannt. Wichtig ist daher die Möglichkeit, Cholinesterasen, die an Phosphorsäureester gekoppelt sind, wieder zu reaktivieren; sie können dann, ebenso wie zuvor die freien, der Aktivitätsbestimmung zugeführt werden. Erhält man nach der Behandlung mit einem Reaktivator im gleichen Serum einen höheren Cholinesterase-Wert als ohne solche Behandlung, so kann man nach den bisherigen Erfahrungen mit Sicherheit von einer Vergiftung sprechen.

Friedberg und Sakai (14) haben sich 1958 schon mit diesem Problem befaßt und versucht, die Cholinesterase mit dem Antidot PAM (Pyridin-Aldoxim-Methjodid) zu reaktivieren. Kommt zu einem Serum PAM hinzu, so wird dieses mit seinem quaternären Stickstoff von der anionischen

Stelle des Fermentes angezogen. Es kann die sog. nucleophile Gruppe der Verbindung, der durch Doppelbindung auf die esteratische Stelle gerichtete Oximrest, die Lösung des Alkylphosphates erreichen und damit das Ferment reaktivieren.

In hoher Konzentration bewirkt PAM selbst eine Hemmung der Cholinesterase, bei zu geringer Konzentration ist eine Reaktivierung unter Umständen nicht mehr nachzuweisen. Friedberg und Sakai (14) verwendeten das PAM in Verdünnung 1 : 1000 im Ansatz ihrer Versuche.

Die Autoren benutzten zur Cholinesterase-Aktivitätsbestimmung die manometrische Methode von Ammon (1) mit der Warburg-Apparatur, etwas modifiziert.

Sie erzielten Cholinesterase-Reaktivierungen bei Tieren, die mit E 600, E 605 oder Systox vergiftet waren, und sie bestätigten diese Ergebnisse bei 12 Vergiftungsfällen von Menschen für Leichenmaterial.

Gleichzeitig beobachteten sie zwei Vorgänge, die mit der Dauer der Vergiftung die Nachweismöglichkeit begrenzen: einerseits die spontane Reaktivierung des Fermentes und andererseits einen fortschreitenden Verlust der Reaktivierbarkeit durch PAM.

C) Methoden zur Bestimmung der Serum-Cholinesterase-Aktivität

Um die Serum- von der Erythrocyten-Cholinesterase zu trennen, wird meist das Plasma oder Serum von den übrigen Blutbestandteilen abzentrifugiert. Man kann sich jedoch zur Bestimmung auch die verschiedenen Eigenschaften der beiden Fermente, dem Substrat gegenüber, zunutze machen (Augustinsson (3)): Die Serumcholinesterase spaltet besonders gut die Cholinester Butyrylcholin und Benzoylcholin sowie o-Nitrophenylbutyrat. Die Substrate zur Bestimmung der Erythrocyten-Cholinesterase-Aktivität sind vor allem Acethylcholin und Acetyl-ß-methylcholin.

Seit Jahren werden zur Aktivitätsbestimmung Methoden entwickelt und modifiziert. Aus der Fülle der Möglichkeiten werden hier ohne Anspruch auf Vollständigkeit zunächst einige Bestimmungsverfahren angeführt unter weitgehender Bezugnahme auf die Zusammenfassung von Stumpf (59).

I. Bestimmung des nicht umgesetzten Substrates

Eine empfindliche chemische Methode für die Bestimmung von Acetylcholin wurde von Hestrin (1949) (26) beschrieben. Sie beruht auf Reaktionen, die zuvor bei Testflecken-Methoden für Carboxylsäuren, Ester und Anhydride verwendet wurden. Der Ester reagiert mit Hydroxylamin zu Acethydroxamsäure, welche in saurer Lösung einen löslichen purpurroten Komplex mit Fe^{III}-Ionen bildet. Die Farbintensität ist proportional dem vorhandenen Acetylcholin.

Huerga, Yesinick und Popper (27) haben in Anlehnung daran folgende Versuchsanordnung angegeben:

0,2 ml Serum oder Plasma werden mit 2 ml ACh-Puffer-Salzlösung versetzt und 60 Minuten lang bei 37 ° inkubiert. Anschließend werden dem Reaktionsgemisch 2 ml alkalische Hydroxylaminlösung und 1 Minute später 6 ml verdünnte HCl zugefügt und gemischt. 0,5 ml dieser Mischung werden mit 10 ml $FeCl_3$-Lösung versetzt, durchmischt und dann zentrifugiert. Bei 540 mμ wird colorimetrisch gemessen. Zum Leerwert wird statt Serum Wasser verwendet; er gibt die Spontanhydrolyse an.

Die Erythrocyten-Cholinesterase-Aktivität im Vollblut bestimmen Fleisher und Pope (12) durch eine analoge Reaktion.

Von Pilz (48) wurde 1958 eine gute photometrische Mikromethode zum Nachweis der Acetylcholinesterase-Aktivitäten angegeben. Das Prinzip der Methode ist die Bestimmung des nicht umgesetzten Acetylcholins, wobei der Ester mit alkalischem Hydroxylamin zu Acethydroxamsäure, die mit Eisen (III)-Salzen rote Färbung liefert, umgesetzt und colorimetrisch gemessen wird.

Erforderliche Reagentien und Lösungen:

a) Natronlauge 2,5 n : 50 g NaOH werden mit Wasser zu 500 ml gelöst.

b) Hydroxylamin: 35,0 g $NH_2OH \cdot HCl$ werden mit Wasser zu 500 ml gelöst. Diese Lösung ist nicht länger als 4 Wochen haltbar.

c) Eisenlösung: 337,5 g $Fe_2(SO_4)_3 \cdot (NH_4)_2 \cdot SO_4 \cdot 24\ H_2O$, Mol 964,43 (Merck) werden unter Zusatz von

25 g KNO_3 mit Wasser zu 1000 ml gelöst.

d) Puffer 1,4 : 10,5 g Citronensäure (Monohydrat) und 4,0 g NaOH werden in wenig Wasser gelöst, 445 ml 1n HCl zugesetzt und mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Zur Prüfung verdünnt man 5 ml davon auf 50 ml; die so erhaltene Lösung muß einen pH-Wert von 1,4 haben.

e) Puffer 4,62 : 200 ml 1n Essigsäure und 100 ml 1n NaOH werden mit Wasser zu 1000 ml verdünnt.

f) Boratpuffer: 31,0 g $B(OH)_3$ (Merck) werden in etwa 700 ml Wasser gelöst und nach Zugabe von 20 ml 1n NaOH zu 1000 ml aufgefüllt.

g) Acethylcholinstammlösung: 0,7266 g Acetylcholinhydrochlorid werden in 50 ml Puffer 4,62 gelöst und mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

h) Substratlösung: 20 ml Acethylcholinstammlösung + 20 ml Boratpuffer werden auf 1000 ml aufgefüllt. Diese Lösung ist bei Zimmertemperatur einen Tag haltbar, muß einen pH-Wert von 7,3 $\pm$ 0,2 haben und enthält in 5 ml 8 µAq Acethylcholin.

i) Saponinlösung: 0,01 % in Wasser.

k) Physiologische Kochsalzlösung.

Bemerkung: Die Acethylcholin-Stammlösung ist, wenn sie in Polyäthylen-Flaschen und im Kühlschrank aufbewahrt wird, wenigstens 6 Wochen haltbar. Die Substratlösung muß jeden Tag frisch angesetzt werden.

Die Arbeitsvorschrift:

4 Meßkolben zu 50 ml werden mit VE, ME, VS und MS bezeichnet (V = Vergleichslösung, E = Erythrocyten, S = Serum). In 2 Zentrifugengläschen (I und II) gibt man zu je 1 ml phys. NaCl-Lösung 0,02 ml Vollblut. Man schüttelt kräftig um und zentrifugiert 5 Min. bei 3000 U/min. Die überstehende Lösung aus I wird in MS gebracht, der Rückstand aufbewahrt; die überstehende Lösung aus II wird in ein drittes Zentrifugenröhrchen (III) gegeben, welches ebenfalls aufbewahrt wird, während die Erythrocyten aus II in 1 ml Saponinlösung gelöst und dann mit 3-5 ml H_2O in den Meßkolben ME gespült werden. In alle 4 Meßkolben werden jetzt je 5ml Substratlösung pipettiert. Man schüttelt gut um und inkubiert bei 37 ^{o} C im Brutschrank genau 30 Min. Währenddessen bereitet man die nötige Menge alkalisches Hydroxylamin durch Mischen gleicher Teile 2,5 n NaOH und Hydroxylaminlösung. Nun pipettiert man je 5 ml davon in die 4 Meßkolben und in einen fünften Meßkolben zu 50 ml (den man mit 0 bezeichnet), schüttelt gut um und bringt sofort den Inhalt von III in den Kolben VS und spült den Rückstand in I nach Lösen in 1 ml Saponinlösung mit etwa 5 ml Aqua dest. in VE.

Jetzt werden die folgenden Reagentien in alle 5 Meßkolben gebracht: 5 ml Puffer 1,4 und 10 ml Eisenlösung. Man füllt zur Marke auf und läßt nach gutem Umschütteln 15 - 20 Min stehen. Anschließend filtriert man durch trockene, doppelt gelegte Faltenfilter in etwa 50 ml fassende Kölbchen, wobei man die ersten Filtratanteile verwirft. Sogleich danach soll die photometrische Messung bei 490 mμ und 20 mm Schichtdicke erfolgen.

Berechnung:

Berechnungsfaktor F : F = 1,04 (Definition: Ext. $\frac{490\,m\mu}{10\,mm}$. F = μ Aq Ester . ml^{-1})

Berechnungsfaktor F^+ : $F^+ = 26$

er erfüllt folgende Gleichung:

Ext. $\frac{490\,m\mu}{20\,mm}$. F^+ = μ Aq Acetylcholin insgesamt.

Die Gleichung ist nur dann erfüllt, wenn gegen 0 als Leerwert gemessen wird.

VE gibt die eingesetzte Menge Acetylcholin an, ME die nach der Bebrütung nicht gespaltene Menge. Die Aktivität des Fermentes ergibt sich demnach aus der 26-fachen Differenz der Extinktionen von VE und ME (desgleichen bei Serum mit VS und MS).

Berechnungsbeispiel:	Ext. VE	= 0,316
	Ext. ME	= 0,212
	Differenz	0,104

Die Aktivität der Erythrocytenesterase ist:

Ext. Diff. x 26 = 0,104 . 26 = 2,73 μ Aq.

Pilz (48) erinnert daran, daß das menschliche Serum Ester, z. B. Fette usw. enthält, die zum Teil mit in die Bestimmung eingehen. Da aber sowohl in den MS- als auch in den VS-Ansätzen dieselbe Menge Serum während der Umsetzung mit alkalischem Hydroxylamin anwesend ist

und die Aktivität aus der Differenz der Extinktionen errechnet wird, entfällt der störende Einfluß.

II. Bestimmung der Spaltstücke

1. Säurekomponente:

a) Gasanalytische Methoden

Bei diesen Versuchen wird die enzymatische Esterhydrolyse in einem Bikarbonatpuffer durchgeführt. Das durch die abgespaltene Carbonsäure aus dem Bicarbonat freigesetzte Kohlendioxyd wird gasometrisch gemessen.

Nach Ammon (1) erfolgt die Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität in der Warburg-Apparatur. Vor Versuchsbeginn werden die Warburg-Gefäße etwa 15 Minuten lang im Wasserbad geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wird auf den pH-Wert 7,3 - 7,4 eingestellt mit Ringerlösung als Verdünnungs- und Lösungsmittel und mit einem Gemisch von 95 % N_2 und 5 % CO_2 als Gasphase. Die Temperatur des Wasserbades beträgt 37,5 ^{o} C. Im Seitentrog der Warburg-Gefäße befinden sich 0,5 ml einer 2 %igen Serumverdünnung, im Haupttrog 1,5 ml einer 0,5 %igen Acetylcholinchlorid-Lösung. Die sich nach dem Einkippen entwickelnde Kohlensäure wird 6 Mal in Abständen von jeweils 10 Minuten abgelesen. Die Ergebnisse werden am günstigsten in Form der b_{30} - Werte angegeben (Augustinsson (3)): Dabei ist b_{30} die initiale Hydrolysengeschwindigkeit, extrapolierter Wert der CO_2-Entwicklung in µl innerhalb einer Zeit von 30 Minuten (= a_{30}) abzüglich der durch die Spontanhydrolyse bedingten CO_2-Entwicklung

innerhalb derselben Zeit. Die Umrechnung von µl CO_2 auf µl hydrolysiertes Acetylcholin ist leicht möglich; dabei entspricht 1 µl CO_2 = 8,1 µg Acetylcholinchlorid, bzw. 1 mg Acetylcholinchlorid = 123,5 l CO_2.

Ammon und Zapp (2) teilten noch eine einfachere Apparatur zur Durchführung der Ammon'schen Methode mit; die Untersuchung stimmt mit dem ursprünglichen Verfahren überein.

Modifiziert wurde die Methode von Cesaire (4), der den pH-Wert des Reaktionsgemisches durch einen Überschuß von Bicarbonat während einer 20 Minuten dauernden Inkubationszeit in engeren Grenzen konstant hält.

Stedman und Stedman (55) und Nachmansohn und Lederer (45) verwenden für die gasanalytische CO_2-Bestimmung statt eines Warburg-Apparates ein Barcroft'sches Differentialmanometer, während Rinkel und Pijoan (53) und Friend und Krayer (13) dazu einen Van-Slyke-Apparat benützen.

b) Elektrometrische Methoden

Bei diesen Methoden wird der pH-Wert des aus Ferment und Substrat bestehenden Reaktionsgemisches während der Esterhydrolyse laufend potentiometrisch gemessen (59).

Schon 1927 beschrieben Willstätter, Kuhn, Lind und Memmen (64) eine Titrationsmethode für die Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität in der Leber. 10 Jahre später wurde von Glick (16) die "kontinuierliche elektrometrische Titrationsmethode" mitgeteilt:

Bei konstanter Temperatur (25 ^{o} C) wird zu einer Mischung

von z. B. 20 ml 0,2 %igem Acetylcholinchlorid (Substrat) und 0,2 ml Serum (Ferment) kontinuierlich tropfenweise 0,02 n NaOH zugesetzt mit derartiger Geschwindigkeit, daß der pH-Wert praktisch konstant bleibt. In der, innerhalb einer bestimmten Zeit, verbrauchten Laugenmenge, wird die Cholinesterase-Aktivität gemessen.

Um die zur Neutralisation geringster Laugenmengen notwendige Zeit genauestens zu bestimmen, wird nach Sanz (54) eine Apparatur mit Glas- und Kalomel-Elektrode verwendet, mit welcher in 2 Minuten 1 - 2 Ablesungen vorgenommen werden. Der Vorteil ist, daß eine Cholinesterase-Aktivitätsbestimmung in etwa 10 Minuten durchführbar ist.

Mit Kalomel- und Antimon-Elektrode arbeiten Delaunois und Casier (7), die noch in kleinsten Mengen von Serum bzw. Erythrocytenaufschwemmungen die Cholinesterase-Aktivität messen.

In einem doppelwandigen Gefäß, dessen Temperatur durch Wasserdurchströmung konstant gehalten wird, läßt man bei 30 ^{o} C die Reaktion ablaufen. Zur Neutralisation wird mit einer Mikrobürette 0,01 n NaOH zugesetzt. Das Potentiometer wird mit einem Boratpuffer auf den pH-Wert 8 eingestellt. Vor jeder Bestimmung wird zunächst die Acethylcholin-Spontanhydrolyse ermittelt. Hierzu wird eine Acetylcholin-Aqua dest.-Mischung durch NaOH-Zusatz auf den pH-Wert 8 gebracht und dann etliche Male die Zeit bestimmt, die man benötigt, um nach einem Zusatz von NaOH wieder den gleichen pH-Wert zu erreichen. Nach 15 - 20 Minuten wird dem Reaktionsgemisch Serum oder eine Erythrocyten-Aufschwemmung zugesetzt und nun erst die enzymatische Acetylcholin-Hydrolyse bestimmt. Wieder

wird mit NaOH der pH-Wert 8 eingestellt und wieder wird die Zeit bis zum Abfall des pH-Wertes auf den ph-Wert 8 gestoppt. Innerhalb von 20 Minuten wird dieser Vorgang öfter wiederholt.

Die Cholinesterase-Aktivität wird in ml 0,01 n NaOH pro 1 ml Serum pro 20 Minuten abzüglich des durch die Acetylcholin-Spontanhydrolyse bedingten Laugenverbrauches angegeben.

Von Michel (43) wurde eine Methode beschrieben, bei welcher die enzymatische Säureproduktion in einem Standard-Puffer-System durchgeführt und der pH-Wert-Abfall pro Zeiteinheit potentiometrisch gemessen wird.

Zur Bestimmung von Plasma- und Erythrocyten-Cholinesterase-Aktivitäten werden verschiedene Puffer angewandt. Hier sei nur die Methode für das Serum angeführt.

Reagentien:

Puffer: 0,006 M Veronal-Natrium (1,2371 g), 0,001 M KH_2PO_4 (0,1361 g), 0,30 M NaCl (17,535 g). Um einen Liter Puffer zu erhalten, löse man die Reagentien in 900 ml Aqua dest., füge 11,6 ml 0,1 n HCl hinzu und verdünne zum Volumen. Der Puffer sollte den pH-Wert 8 bei 25 ^{o} C betragen.

Acetylcholin-Substrat: 0,165 M Acetylcholinchlorid (3 g in 100 ml Aqua dest.). Einige Tropfen Toluol als Konservierungsmittel werden zu allen bisher genannten Lösungen zugefügt und diese im Eisschrank aufbewahrt. Jedesmal bei Bedarf frisch hergestellt werden: 0,01 %

Saponin und 0,90 % NaCl.

Arbeitsvorschrift:

Das Plasma wird mit Wasser derart verdünnt, daß jeder ml Flüssigkeit 0,02 ml Plasma enthält. 1 ml dieses verdünnten Plasmas wird mit 1 ml Puffer gemischt, dann diese Lösung im Wasserbad von 25 ^{o} C 10 Minuten lang equilibriert. Mit einem pH-Meter wird zunächst der Anfangs-pH-Wert gemessen. Dann werden rasch 0,2 ml der 0,165 M Acetylcholinlösung beigemischt und diese Zeit wird gemessen. Die enzymatische Reaktion darf 1 1/2 Stunden fortschreiten, ehe der End-pH-Wert gemessen wird. Nach folgender Formel wird die Cholinesterase-Aktivität in Δ pH/St. gemessen:

$$\Delta \text{ pH/St.} = \frac{(pH_1 - pH_2 - b)}{(t_2 - t_1)} \quad f$$

pH_1 = Anfangs-pH-Wert
pH_2 = End-pH-Wert
t_1 = Zeit des Mischens mit Acetylcholin
t_2 = Zeit bis zum Ende der Reaktion
b = Korrektur der nicht enzymatischen Hydrolyse, zu pH_2-Wert gehörend
f = Korrekturfaktor des Δ pH/St entsprechend verschiedenem pH-Wert, pH_2-Wert zugeordnet.

Meyer und Wilbrandt (42) modifizierten die Michel'sche Methode und konnten nun auch in kleineren Blutmengen die Cholinesterase-Aktivität bestimmen.

Aus heparinisiertem Vollblut wird durch Zentrifugieren

Plasma gewonnen, von welchem 0,04 ml mit Aqua dest., einer Pufferlösung vom pH-Wert 8 und wässriger Acetylcholinchlorid-Lösung versetzt werden. Bei konstanter Temperatur von 25 ^{o} C wird mit einem pH-Meter mit Glas- und Kalomel-Elektrode der pH-Wert-Abfall pro Stunde gemessen.

(Zusammensetzung des Puffers: 1,2371 g Na-Barbital, 0,1361 g KH_2PO_4, 17,535 g NaCl und 11,6 ml 0,1 n HCl, zu 1 Liter gelöst).

Wenn Butyrylcholin als Substrat verwendet wird, kann auch im Vollblut die Serumcholinesterase-Aktivität ermittel werden.

Mac Donald, Pollard und Gropp (39) beschreiben die Anwendung der Michel'schen Methode zur Bestimmung der Erythrocytencholinesterase-Aktivität im Vollblut. Sie verwenden Acetylcholin- und Salzkonzentrationen, bei denen die Erythrocytencholinesterase maximal aktiviert, die Serumcholinesterase hingegen weitgehend gehemmt wird.

Hamblin und Marchand (23) und Wolfsie und Winter (66) modifizierten ebenfalls die Michel'sche Methode, besonders für kleine Blutmengen.

Davies und Rutland (6) finden, daß bei der Michel'schen Methode zur Erzielung genauer Resultate ein pH-Wert-Abfall von mehr als 0,1 pro Stunde gefordert werden muß.

Tammelin und Mitarbeiter (60, 61, 62) verwenden für die

Methode nach Michel einen Apparat mit 6 gesättigten Glas-Kalomel-Elektroden, denen ein pH-Meter und ein Registriergerät angeschlossen sind, so daß 6 Cholinesterase-Aktivitätsbestimmungen gleichzeitig durchgeführt werden können.

c) Colorimetrische Methoden

Verfahren, bei welchen die Farbänderung eines Indikators als Kriterium der Cholinesterase-Aktivität verwendet wird, wurden von Drouet, Verain und Franquin (8) und von Limperos und Ranta (50) angegeben.

Modifiziert wurde dieses Verfahren von Wolfsie und Winter (67), die für die Versuche nur ein Melangeur für Leukocyten, ein 2 ml Serumröhrchen, eine 1,2 %ige wässrige Acetylcholinjodid-Lösung und eine 0,05 %ige wässrige Bromthymolblaulösung benötigten. Als Verdünnungsmittel wird destilliertes, entionisiertes Wasser (pH-Wert 6,8 - 7,0) benützt. Bestimmt wird die Gesamt-Cholinesterase-Aktivität des Blutes.

Methode: Aus der Fingerbeere entnommenes Blut wird bis zur Marke 0,5 des Melangeurs aufgezogen, bis Marke 11 mit Bromthymolblaulösung verdünnt, kurz durchgeschüttelt und in das Serumröhrchen ausgeblasen. (Die Außenseite des Melangeurs muß nach dem Aufziehen des Blutes gereinigt werden). Nun wird noch einmal bis Marke 11 Bromthymolblaulösung aufgezogen und diese ebenfalls in das Serumröhrchen ausgeblasen. Dann wird Acetylcholinjodid-Lösung bis Marke 11 in den gleichen Melangeur aufgezogen und der Serum-Bromthymolblaumischung zugefügt. Das Röhrchen wird mit einem Gummistopfen verschlossen, geschüttelt; dann wird die Farbe des Inhalts im Abstand

von ca. 2,5 cm gegen einen weißen Hintergrund betrachtet; sie soll grün sein. (Wäre die Farbe olivbraun oder olivgrün, müßte der Ansatz mit frisch zubereiteten Lösungen wiederholt werden). 20 Minuten lang wird das Röhrchen dann bei 37 ^{o} C bebrütet und dann erneut die Farbe bestimmt.

Beurteilung der Färbung: Orange - 100 %, braun - 75 %, olivbraun - 50 %, olivgrün - 25 %, grün - 0 % der durchschnittlichen normalen Cholinesterase-Aktivität des Blutes.

Eine weitere Modifikation des Bromthymolblautestes wurde von Herzfeld und Stumpf (25) ausgearbeitet.

Auf ein mit Acetylcholin und Bromthymolblau imprägniertes Testpapier (Acholest) wird eine kleine Menge Serum (0,05 ml) aufgebracht. In 10 - 30 Minuten ändert sich die Farbe, so daß mit einer Vergleichsfarbskala die Serumcholinesterase-Aktivität näherungsweise ermittelt werden kann. Die Verff. vermeiden bei diesem Test absichtlich jede Serumverdünnung, um bei etwaiger Hemmung der Serumcholinesterase durch reversible Hemmkörper jeden Verdünnungseffekt nach Goldstein (17) auszuschließen.

Exaktere Ergebnisse erhalten Davies und Nicholls (5) mit ihrer Modifikation der Methode von Limperos und Ranta (36), welche die Zeit bis zum Auftreten eines bestimmten Farbtones ermitteln.

Werden die Farbänderungen des Indikators nicht mit freiem Auge beurteilt, sondern colorimetrisch gemessen, so er-

hält man wesentlich genauere Resultate. Bei derartigen Verfahren wird die enzymatische Hydrolyse in einem schwachen Puffersystem durchgeführt und als Indikator Phenolrot zugesetzt. Reinhold, Tourigny und Yonan (51) messen den Extinktionsabfall colorimetrisch, Gregoire und Cotte (20) messen spektrophotometrisch bei 558 mμ alle 30 Sekunden über 10 - 20 Minuten.

Die oben erwähnte Methode von Willstätter, Kuhn, Lind und Memmen (64), die Titrationsmethode zur Bestimmung der Leberesterase, wurde von Stedman, Stedman und Easson (56) für die Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität modifiziert. Um bei einem Reaktionsgemisch aus 1 % Serum und 0,1 % Acetylcholin- oder Butyrylcholinchlorid den pH-Wert 7,4 konstant zu erhalten, wird kontinuierlich 0,0225 n NaOH zugegeben. Indikator ist ebenfalls Bromthymolblau. Gemessen wird die Cholinesterase-Aktivität in ml verbrauchter NaOH pro Zeiteinheit.

Stedman, Stedman und White (57) verwenden als Indikator Kresolrot und führen dieselbe Reaktion bei einem pH-Wert von 8 durch.

Hall und Lucas (22), Glick (15), Pighini (47), Longo, Sorrentino und Colaciuri (38), Morand und Laborit (44) arbeiten nach dem gleichen Prinzip. Ihre Indikatoren sind Kresolrot, Bromthymolblau oder Phenolphthalein. Sie titrieren vorwiegend mit einer 0,01 n NaOH.

2. Alkoholkomponente:

a) Verschiedene Methoden

Nachgewiesen wird die Alkoholkomponente von Acetylthiocholin oder Butyrylthiocholin, Substraten, die von Koelle (31, 32) ursprünglich zum histochemischen Nachweis der Cholinesterasen benützt wurden.

Meyer und Wilbrandt (42) bestimmen mit den Thiocholinestern als Substrat die Serumcholinesterase-Aktivität oder die Erythrocytencholinesterase-Aktivität, indem sie das abgespaltene Thiocholin jodometrisch oder indikatorimetrisch mit einem Redox-Indikator messen.

Ravin, Tsou und Seligman (50) verwenden als Substrat für Serumcholinesterasen Corbonaphthoxycholinjodid. ß-Naphthol wird mit tetrazotiertem Di-o-anisid gekuppelt und die Azofarbe nach Ausschütteln mit Äthylacetat colorimetrisch bestimmt.

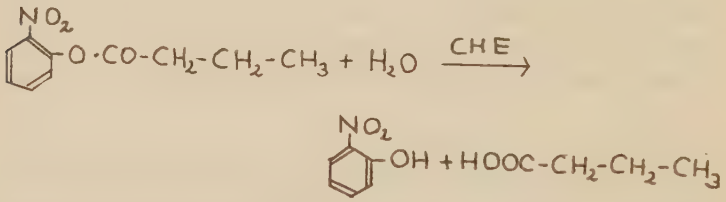
Ein weiteres Substrat der Cholinesterase, dessen Alkoholkomponente leicht nachgewiesen werden kann, ist Phenylbenzoat (Stumpf (59)). Rider, Moeller und Du Bois (52) modifizieren unter Verwendung derselben die Esterasebestimmungsmethode nach Gomori (18). Das abgespaltene Phenol wird mit einem Diazoreagens gekuppelt und colorimetrisch nachgewiesen.

b) Die Methode von Main, Miles und Braid zur Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität (41) mit o-Nitrophenyl-Butyrat

1947 beschrieben Huggins und Lapides (28) die Verwendung

von p-Nitrophenyl-Carboxyl-Estern als Substrat zur Cholinesterase-Aktivitätsbestimmung. Davon ausgehend entwickelten Main, Miles und Braid (41) eine empfindliche colorimetrische Testmethode zur Messung der Aktivität der Serumcholinesterase.

Prinzip der Methode: Die Cholinesterase spaltet das in der Verdünnung nur äußerst schwach gelbe o-Nitrophenylbutyrat in leuchtend gelbes o-Nitrophenol und Buttersäure:



Im Spektrophotometer wird dessen Extinktion gegen einen Leerwert gemessen und auf einer Eichkurve die entsprechende Aktivität der Cholinesterase abgelesen.

c) Reagentien

Phosphat-Puffer: 9 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ und 160 g $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ werden mit Aqua dest. zu 1 Liter gelöst, so daß man einen 500 mM Phosphat-Puffer von einem pH-Wert ~ 7,6 erhält. Diese Lösung wird vor Gebrauch 1 : 10 verdünnt.

Di-isopropyl-fluorophosphat (DFP): 0,10 ml hiervon werden mit iso-Propylalkohol zu 25 ml verdünnt. Die DFP-Konzentration liegt somit um 25 mM.

o-Nitrophenylbutyrat: Verff. beschreiben ein Herstel-

lungsverfahren (41). Das Präparat ist auch im Handel erhältlich (Firma Nutritional Biochemicals Corporation, 21010 Miles Avenue, Cleveland 28, Ohio).

Substrat-Stammlösung: Um die von Verff. geforderte 0,5 M Lösung zu erhalten, müßte man 1,05 g o-Nitrophenylbutyrat in 10 ml Methanol lösen. Da man aber zu Cholinesterase-Aktivitätsbestimmungen nur sehr wenig dieser Substratstammlösung benötigt, ist es ausreichend, nur 0,105 g in 1 ml Methanol zu geben. o-Nitrophenylbutyrat ist flüssig in Ampullen erhältlich. Für praktisches Arbeiten genügt es, 0,1 ml (Inhalt einer Blutzuckerpipette) in 1 ml Methanol zu bringen. Diese Lösung ist einige Wochen lang haltbar, wenn man den pH-Wert des Methanols zuvor mit Eisessig auf 5 gebracht hatte.

Butanol-Phosphat-Puffer: Zu 95 ml des 1 : 10 verdünnten Phosphat-Puffers werden 5 ml n-Butanol gegeben. Gemisch gut Schütteln! Ein Teil davon wird als "eiskalter Butanol-Phosphat-Puffer" im Eisschrank aufbewahrt.

Substrat-Pufferlösung: In 10 ml des Butanol-Phosphat-Puffers werden 0,030 ml (mit Blutzuckerpipette) der Substratstammlösung gebracht. Es empfiehlt sich, diese 0,030 ml unter den Puffer zu blasen.

Äthanol: Für jeden Ansatz benötigt man ca. 4 ml 50 %iges Äthanol.

Blutserum und Serum-Verdünnung: Benötigt werden 0,02 ml (Blutzuckerpipette) Serum (oder Plasma) pro Ansatz. Diese

werden in 5 ml des erwähnten "eiskalten Butanol-Puffers" gelöst. Man beachte, daß diese Lösung nur 30 Minuten haltbar ist!

d) Arbeitsgang

1. In ein Reagenzglas A (=Probe) und in ein Reagensglas L (Leerwert) bringt man je 5 ml der Substrat-Pufferlösung.

2. In Röhrchen L kommen sofort 0,05 ml DFP-Lösung (mit Blutzuckerpipette). Damit wird die Enzymaktivität der Cholinesterase unterbunden.

3. In Glas A und L gibt man je 1 ml der Serum-Verdünnung.

4. Beide Gläser werden 30 Min. im Wasserbad bei 25,0 ° C ± 0,1 inkubiert.

5. Anschließend wird mit 0,05 ml DFP-Lösung die Spaltung des o-Nitrophenylbutyrats auch im Reagenzglas A gestoppt.

6. In beiden Reagenzgläsern (A und L) wird mit 50 %igem Äthanol ad 10,0 ml aufgefüllt.

7. Im Zeiss-Photometer wird mit einer 20 mm Cüvette bei 414 mμ die Extinktion von A gegen L gemessen.

8. Die tatsächliche Cholinesterase-Aktivität, gemessen in γ o-Nitrophenol, wird an der Eichkurve abgelesen.

9. Zur Umrechnung von γ o-Nitrophenol in

$\left(\frac{\mu Mol}{ml \cdot min}\right)$ o-Nitrophenol:

139 γ = 1 μ Mol o-Nitrophenol

$$\left(\frac{\gamma}{0{,}02\ ml \cdot 30\ min}\right) = 1{,}66\bar{6} \left(\frac{\gamma}{ml \cdot min}\right) =$$

$$\frac{1{,}66\bar{6}}{139} \left(\frac{\mu\ Mol}{ml \cdot min}\right) = 1{,}20 \cdot 10^{-2} \left(\frac{\mu\ Mol}{ml \cdot min}\right)$$

Beispiel:

$$\left(\frac{107\ \gamma}{0{,}02\ ml \cdot 30\ min}\right) = 1{,}28 \left(\frac{\mu\ Mol}{ml \cdot min}\right)$$ o-Nitrophenol.

e) Die Bestimmung der Enzymaktivität

o-Nitrophenol kann in Gegenwart von o-Nitrophenylbutyrat bei 2 Absorptionsmaxima gemessen werden. (Abb. 1).

Absorptions-Spektren von o-Nitrophenol und o-Nitrophenylbutyrat.

Die o-Nitrophenol- und die o-Nitrophenylbutyrat-Konzentrationen betrugen 0,15 mM. Das o-Nitrophenol- (nicht ionisiert) Spektrum bei pH 4,5 (——) und das o-Nitrophenylbutyrat-Spektrum (— · —) wurden bestimmt in 20mM Acetat-Puffer. Das o-Nitrophenol-(ionisiert) Spektrum bei pH 9 (– – –) wurde bestimmt in einem 20 mM Borat-Puffer. Die Spektren wurden ermittelt bei 25 °C mit dem selbstregistrierenden Beckmann-Spektralphotometer Modell DK-2 (41).

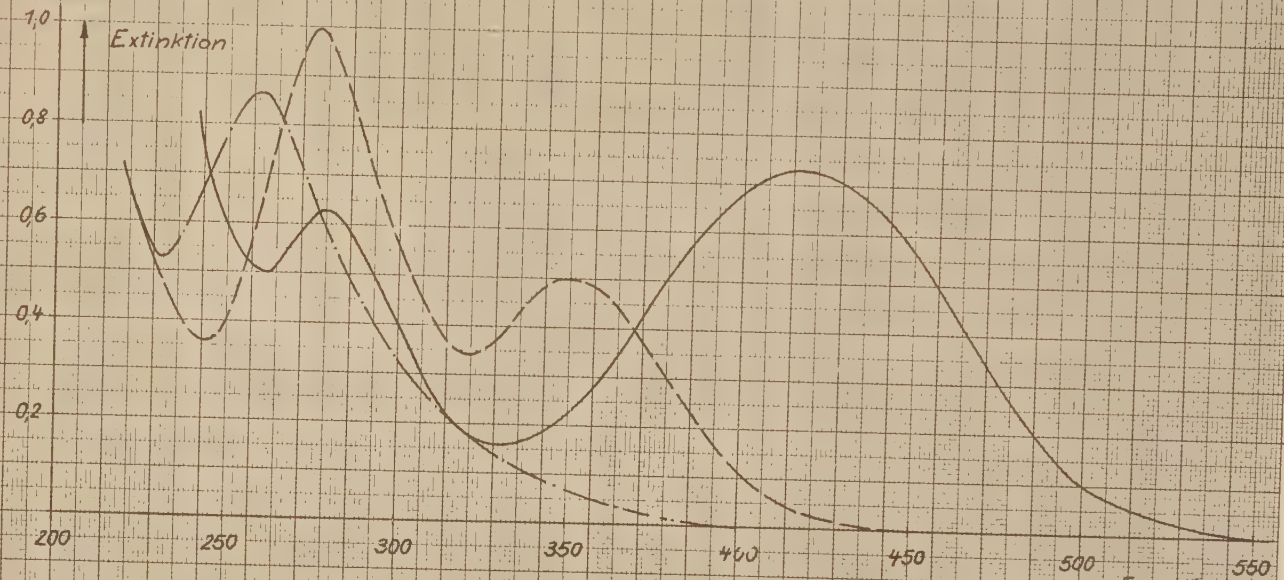


Abb. 1

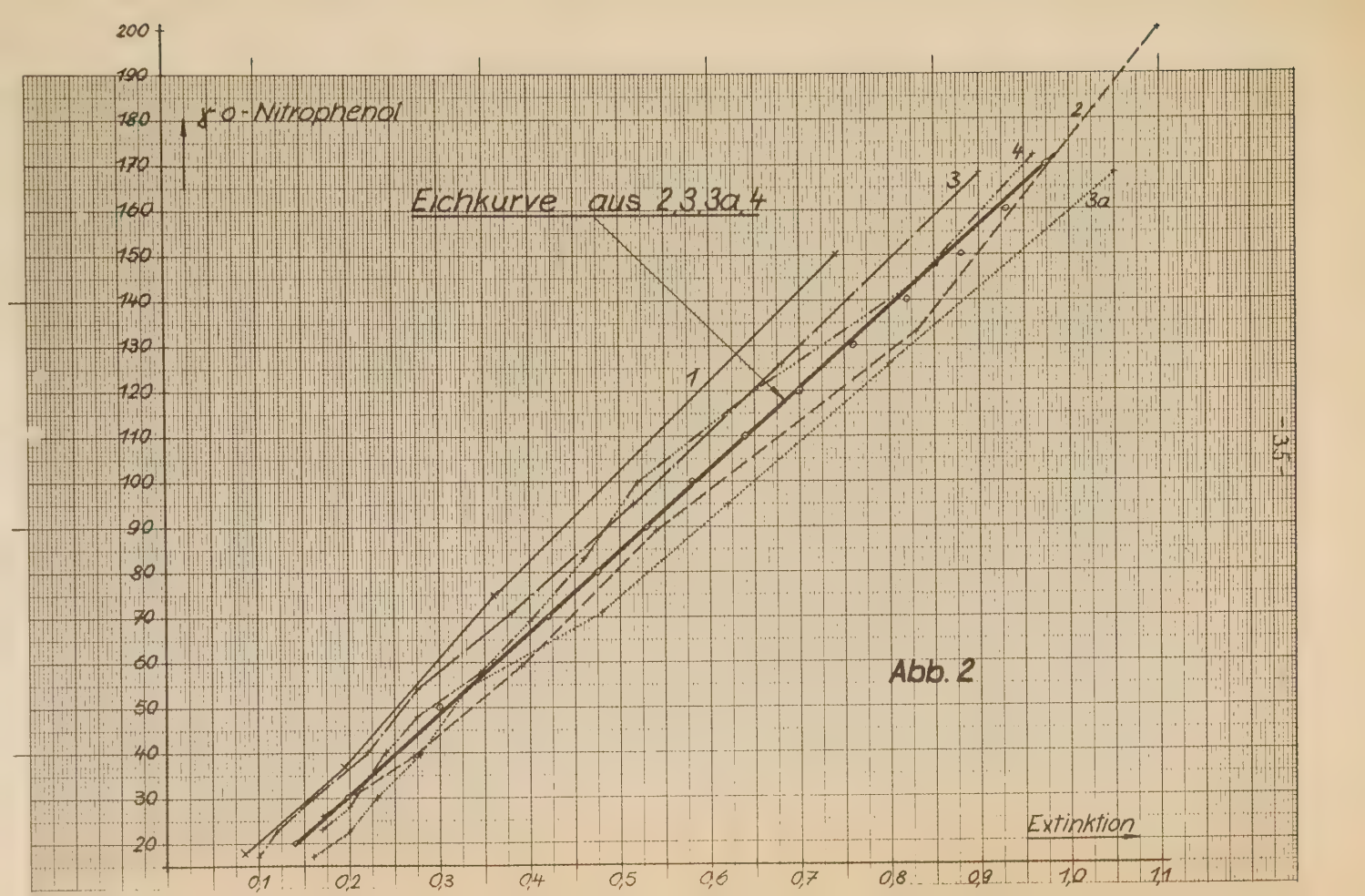
Der Gipfel der Absorptionskurve bei 380 mμ ist der Absorption der nicht ionisierten Form zuzuordnen, der Gipfel bei 414 mμ entspricht der Absorption der ionisierten Form. Da der pK-Wert von o-Nitrophenol bei dem pH-Wert 7,1 liegt, überwiegt die ionisierte Form oberhalb, die nicht ionisierte Form unterhalb dieses pH-Wertes. Der isosbestische Punkt, bei dem die Absorption unabhängig vom pH-Wert ist, liegt bei 371 mμ.

Es hat sich als günstig erwiesen, die o-Nitrophenol-Konzentration bei 414 mμ und dem pH-Wert - 7,6 zu messen, da hier die Empfindlichkeit 1,5 mal höher ist als am isosbestischen Punkt, und die o-Nitrophenyl-butyrat-Absorption praktisch wegfällt. Die Empfindlichkeit könnte weiter gesteigert werden, wenn man den pH-Wert auf 9 bringt, jedoch ist hierbei bereits mit einer Spontanhydrolyse des o-Nitrophenylbutyrats zu rechnen, was zu hohen Leerwerten führt.

f) Die Eichkurve

Die Verff. gaben keine Eichkurven an, so daß selbst eine Kurve mit o-Nitrophenol aufgestellt werden mußte. Gelöst wurden 0,1 g in 5 ml Methanol; diese Lösung wurde als Stammlösung verwendet. Mit Methanol wurden Verdünnungsreihen dieser Stammlösung hergestellt. Jeweils 0,015 ml von jeder Verdünnungsstufe wurden in 5 ml des Butanol-Phosphat-Puffers gegeben. Damit standen o-Nitrophenolmengen von 17,1 - 300 γ für die einzelnen Ansätze zur Verfügung. Zu jedem Ansatz wurde 0,05 ml der DFP-Lösung hinzugegeben. Sodann wurde mit 50 %igem Äthanol auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt.

Darauf wurde die Farbintensität bei 414 mμ gemessen, wobei als Leerwert eine Mischung von 5 ml Puffer, 1 ml H_2O und 4 ml 50 %igem Äthylalkohol diente. Lichtweg 1 cm. Das Meßgerät war ein Zeiss-Spektral-Photometer. Für jede Verdünnungsstufe wurden 4 Meßwerte ermittelt, deren Mittelwerte auf einer Geraden liegen. Die Extinktion von 0,14 entspricht dabei 20 γ o-Nitrophenol, die Extinktion von 0,975 entspricht 170 γ o-Nitrophenol. (Abb. 2).


γ o-Nitrophenol
Eichkurve aus 2,3,3a,4
1
2
3
3a
4
Extinktion
Abb. 2
200
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1,0
1,1

D) Problemstellung

Untersuchungen zur Leistungsfähigkeit der Methode von Main, Miles und Braid (41): Cholinesterase-Aktivitäts-Bestimmungen mit o-Nitrophenylbutyrat

I. Eigene Cholinesterase-Aktivitätsbestimmungen in menschlichem Blutserum

Für gerichtsmedizinische Aussagen ist es wichtig, eine rasche und zuverlässige Methode zur Feststellung des Cholinesterase-Spiegels zu besitzen. Ob diesen Forderungen die o-Nitrophenylbutyrat-Methode von Main, Miles und Braid (41) entspricht, wurde geprüft. Da in ein gerichtsmedizinisches Institut recht verschiedenartiges Blut - mit oder ohne Zusatz von Anticoagulantien, frisch entnommenes oder länger gelagertes Blut - eingesandt wird, sollte diese Methode auf ihre Leistungsfähigkeit für die genannten Fälle untersucht werden.

Es wurden Bestimmungen der Cholinesterase-Aktivität im Serum bei 15 gesunden Personen (13 ♂, 2 ♀) im Alter von 20 - 45 Jahren durchgeführt. Von jeder wurde die Cholinesterase-Aktivität zunächst sofort nach der Blutentnahme (1. Tag) und diejenige nach etwa 24 Stunden (2. Tag) bestimmt. Am 4. und 7. Tag nach der Blutentnahme wurden die Werte von 10 Personen (8 ♂, 2 ♀) festgestellt, am 14., 21. und 28. Tag danach noch von jeweils 5 Personen (4 ♂, 1 ♀).

1. Aktivität in Nativ-Seren (1. Tag):

Aus der Cubitalvene wurden mit einer Recordspritze ca. 1,5 ml Blut entnommen und dieses sofort in ein kleines

Zentrifugengläschen ausgespritzt. Mit einem Glasstab wurde kräftig umgerührt und das Blut bei 3500 Umdrehungen/min. 5 Minuten lang zentrifugiert. Mit der Blutzuckerpipette wurden von dem überstehenden Serum 0,02 ml in 5 ml eiskalten Butanol-Phosphat-Puffer gebracht und nach oben beschriebener Arbeitsweise auf die Cholinesterase-Aktivität untersucht. Das Serum im Zentrifugenröhrchen wurde von den übrigen Blutbestandteilen nicht abgetrennt und für die weiteren Versuche im Eisschrank aufbewahrt.

Am Tag der Blutentnahme (1. Tag) konnten in 15 Nativ-Seren Extinktionen gemessen werden, die den Werten von M. M. und B. (41) entsprechen. Die höchste daraus errechnete Cholinesterase-Aktivität betrug 1,91 $\frac{(\mu \text{ Mol})}{(\text{ml} \cdot \text{min})}$ o-Nitrophenol bei einer Extinktion von 0,92, die geringste 0,48 $\frac{(\mu \text{ Mol})}{(\text{ml} \cdot \text{min})}$ o-Nitrophenol, mit der Extinktion 0,25.

In der Tabelle 1 sind die gemessenen Extinktionen und die Cholinesterase-Aktivität von 15 Personen angegeben.

Name	$\left[\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}}\right]$	gemessene Extionktions-werte
Wa	1,55	0,75
Ho	0,77	0,38
M	1,91	0,92
Wi	1,39	0,68
Op	0,93	0,46
He	1,56	0,66
Ka	0,48	0,25
B	1,68	0,81
A	1,22	0,60
Kr	1,19	0,58
Am	0,93	0,46
Hu	0,97	0,48
Si	1,09	0,54
Me	1,54	0,74
Sc	1,22	0,60

Tabelle 1: Cholinesterase-Aktivität in Nativ-Seren, Ergebnisse des 1. Tages in $\left[\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}}\right]$ o-Nitrophenol und die jeweiligen gemessenen Extinktionswerte

2. Aktivitat in Nativ-Seren, bis 4 Wochen nach Blutentnahme:

In den gleichen Seren wurde auch am nächsten Tag (2. Tag) die Cholinesterase-Aktivität mit der o-Nitrophenylbutyrat-Methode bestimmt. Das Serum konnte ohne erneutes

Zentrifugieren entnommen und untersucht werden.

Die gemessenen Extinktionen lagen nahe bei den Werten des Vortages. Nur in einem Fall trat eine größere Differenz der Cholinesterase-Aktivität auf; sie betrug 0,58 $\frac{(\mu \text{ Mol})}{(\text{ml} \cdot \text{min})}$ o-Nitrophenol.

Am 4. Tag nach der Blutentnahme wurden von 10 Personen die Nativ-Seren geprüft. In einem Fall war eine Aktivitätszunahme zu beobachten, und zwar bei dem niedrigsten Wert des 1. Tages. Die Differenz betrug 0,57 ($\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}}$) o-Nitrophenol. In 9 Fällen wichen die Ergebnisse nur gering von den ursprünglichen Werten ab, so daß die Methode auch für den 4. Tag durchaus brauchbar erschien.

Bei denselben 10 Personen gab es am 7. Tag nach der Blutentnahme wiederum eine größere Abweichung vom Wert des 1. Tages. Diese Differenz der Aktivität betrug 0,56 ($\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}}$) o-Nitrophenol.

Am 14. Tag waren bei 4 geprüften Seren zwei Ergebnisse nur gering abweichend. 2 Werte ergaben eine größere Differenz, und zwar 0,63 ($\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}}$) o-Nitrophenol und 0,47 ($\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}}$).

Von insgesamt 5 Seren, die bis zum 21. Tag aufbewahrt wurden, ließ sich in 2 Seren keine Cholinesterase-Aktivität mehr nachweisen. Die übrigen 3 Seren zeigten nur geringe Abweichungen gegenüber dem 1. Tag.

Am 28. Tag nach der Blutentnahme ergaben die Versuche eine geringe und zwei erhebliche Abweichungen der Esterase-Aktivität.

In den Tabellen 2 und 3 sind die gemessenen Extinktionswerte und die daraus errechneten Cholinesterase-Aktivitäten in den Nativ-Seren vom 1. bis 28. Tag nach der Blutentnahme zusammengestellt.

Tag	1.	2.	4.	7.	14.	21.	28.
Name	gemessene Extinktionswerte						
Wa	0,75	0,75	-	-	-	-	-
Ho	0,38	0,40	0,40	0,44	-	-	-
K	0,92	0,80	-	-	-	-	-
Wi	0,68	0,52	0,51	0,68	0,60	0,62	0,41
Op	0,46	0,47	0,41	0,33	-	-	-
He	0,66	0,66	0,66	0,64	0,54	0,60	0,27
Ka	0,25	0,30	0,52	0,41	0,32	-	-
B	0,81	1,08	0,88	0,76	0,52	-	-
A	0,60	0,60	0,50	0,34	-	-	-
Kr	0,58	0,48	0,50	0,46	-	-	-
Am	0,46	0,54	0,51	0,54	-	-	-
Hu	0,48	0,46	0,66	0,60	-	-	-
Si	0,54	0,46	-	-	-	-	-
Me	0,74	0,64	-	-	-	0,74	0,68
Sc	0,60	0,56	-	-	-	-	-

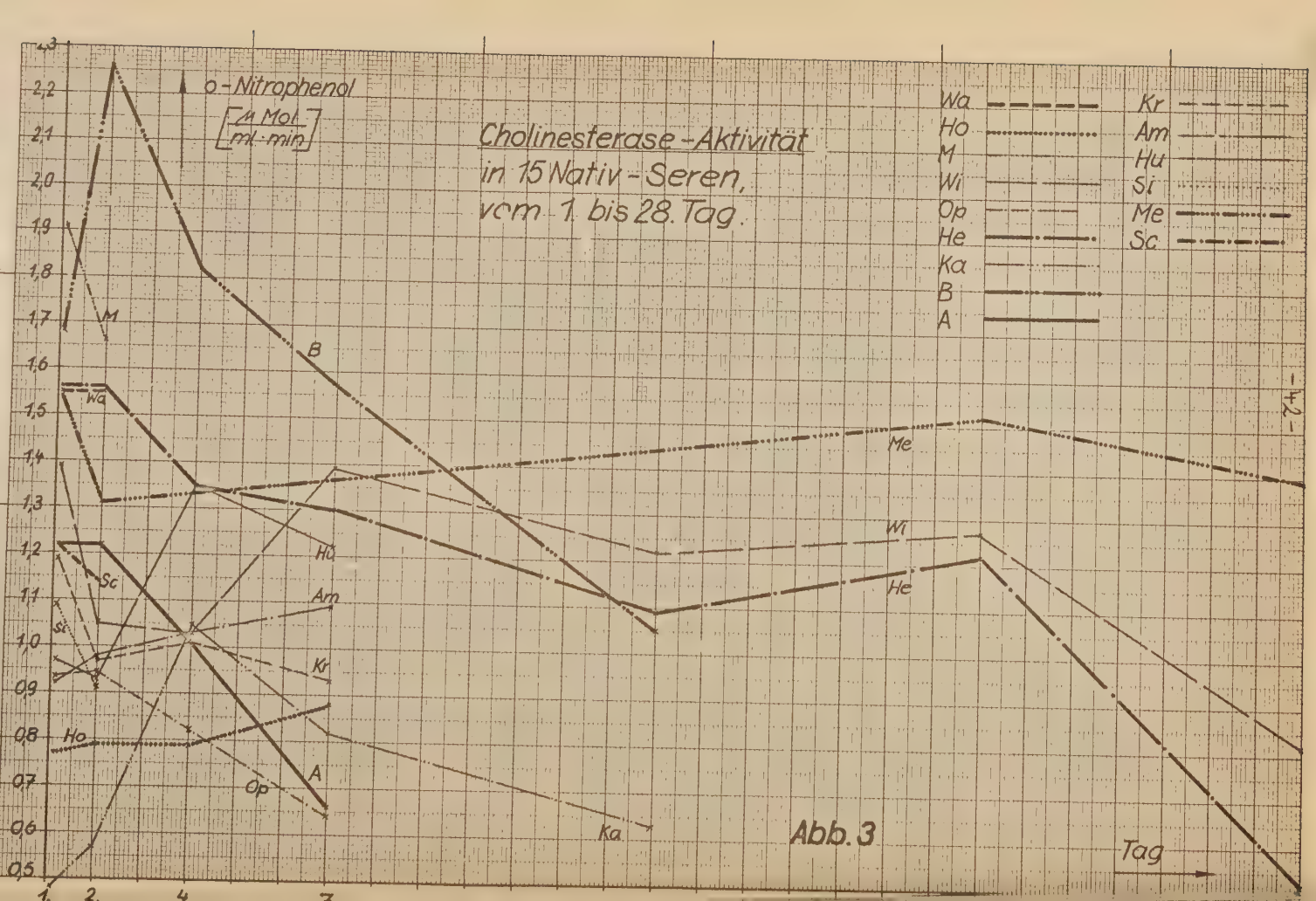
Tabelle 2: Cholinesterase-Aktivität in Nativ-Seren. Gemessene Extinktionswerte des 1. - 28. Tages nach der Blutentnahme.

Tag	1.	2.	4.	7.	14.	21.	28.
Name		($\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}}$) o-Nitrophenol					
Wa	1,55	1,55	-	-	-	-	-
Ho	0,77	0,79	0,79	0,88	-	-	-
M	1,91	1,66	-	-	-	-	-
Wi	1,39	1,05	1,03	1,39	1,22	1,27	0,82
Op	0,93	0,94	0,82	0,64	-	-	-
He	1,56	1,56	1,35	1,30	1,09	1,22	0,52
Ka	0,48	0,58	1,05	0,82	0,63	-	-
B	1,68	2,26	1,82	1,57	1,05	-	-
A	1,22	1,22	1,01	0,66	-	-	-
Kr	1,19	0,97	1,01	0,93	-	-	-
Am	0,93	0,98	1,03	1,09	-	-	-
Hu	0,97	0,92	1,35	1,22	-	-	-
Si	1,09	0,92	-	-	-	-	-
Me	1,54	1,31	-	-	-	1,52	1,39
Sc	1,22	1,14	-	-	-	-	-

Tabelle 3: Cholinesterase-Aktivität in Nativ-Seren in ($\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}}$) - o-Nitrophenol. Ergebnisse des 1.-28. Tages.

Die Abb. 3 zeigt die Cholinesterase-Aktivität in 15 Nativ-Seren, vom 1. - 28. Tag, in ($\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}}$) o-Nitrophenol.

Aus den Versuchsergebnissen läßt sich erkennen, daß die Cholinesterase-Aktivität weitgehend stabil ist und erst nach längerer Zeit sich verändert. Das steht in Übereinstimmung mit den Erfahrungen aus der Literatur.


o-Nitrophenol
[µ Mol / ml · min]
Cholinesterase-Aktivität
in 15 Nativ-Seren,
vom 1. bis 28. Tag.
Wa
Ho
M
Wi
Op
He
Ka
B
A
Kr
Am
Hu
Si
Me
Sc
Tag
Abb. 3

II. Cholinesterase-Aktivität bei Zusatz von Anticoagulantien

1. Die gerinnungshemmenden Substanzen:

Häufig werden entnommenen Blutproben Anticoagulantien zugesetzt. Hierzu werden vorwiegend Citrate, Oxalate, und Fluoride verwendet.

Um die Blutgerinnung zu verhindern, sind folgende Konzentrationen erforderlich (29): Oxalate 1 o/oo, Fluoride 3 o/oo, Citrate 4 o/oo - 1 %.

In neuerer Zeit wird zur Verhinderung der Blutgerinnung auch Liquoid-Roche *) angewandt. Es ist ein polyanetholsulfosaures Natrium, ein synthetisches Anticoagulans. In vitro verzögert der Zusatz von 0,2 - 0,5 o/oo Liquoid-Roche die Blutgerinnung um über 12 Stunden.

Von den im Tierreich vorkommenden Anticoagulantien Heparin, Hirudin und einigen Schlangengiften wurde in dieser Arbeit das Heparin-Präparat "Vetren" verwendet. 20 mg des Pulvers heben die Gerinnungsfähigkeit von 800 ml menschlichen Blutes für etwa 2 Stunden auf.

Über den Einfluß von Anticoagulantien auf die Cholinesterasen bestehen verschiedene Ansichten. Augustinsson (3) schreibt, daß Cholinesterasen stark gehemmt werden durch Fluoride, Oxalate, Citrate, Arsenite und Pyrophosphate. Man nimmt an, daß diese Wirkung durch eine Beseitigung der Ca^{2+} oder Mg^{2+} zustande kommt,

---

*) Wir danken der Firma Hoffmann - La Roche, Grenzach (Baden für die freundliche Überlassung des Präparates Liquoid-Roche

welche Aktivatoren der Cholinesterasen sein sollen.

Bei den Methoden, bei denen zu Cholinesterasebestimmungen das pH gemessen wird, sollen Citrat- und Oxalat- Zusätze ungeeignet sein, da sie störende pH-Wechsel verursachen würden (Edson, Sanderson, Watson und Noakes (9)). Der hemmende Effekt gewisser eisenbindender Anionen (Phosphate, Sulfate, Fluoride, Oxalate) auf die Farbreaktion bei Cholinesterase-Aktivitätsbestimmungen wurde von Lipman und Tuttle (37) bemerkt. Stumpf (59) dagegen teilt mit, daß zur Gewinnung von Plasma das Blut mit Heparin oder Oxalat ungerinnbar gemacht werden kann, ohne daß dadurch die Cholinesterase-Aktivität beeinflußt werden würde.

2. Plasma-Untersuchungen, bis 4 Wochen nach Blutentnahme, mit Anticoagulans-Zusatz:

In weiteren Versuchen wurde geprüft, ob die o-Nitrophenylbutyrat-Methode sich auch dann zu Cholinesterase-Aktivitätsbestimmungen eignet, wenn eine Blutprobe mit einem Anticoagulans vermischt war.

Verwendung fanden NH_4-Oxalat, K-Citrat, Na-Fluorid, Liquoid-Roche und Vetren in den oben angeführten Konzentrationen. Die Anticoagulantien wurden in einem kleinen Mörser zu amorphem Pulver zerrieben und von jedem dann die erforderliche Menge in schmale Zentrifugengläser gebracht.

Nach der Zugabe von je 1,5 ml Venenblut wurden alle Ansätze gut geschüttelt und durchmischt, danach bei 3500 Umdrehungen/min 5 Minuten lang zentrifugiert. Jede Blut-

probe war also mit einem anderen Anticoagulans versehen, und von jeder wurden 0,02 ml Plasma, bzw. Serum in je 5 ml eiskalten Butanol-Phosphat-Puffer gebracht und wie oben beschrieben weiter aufgearbeitet.

Zu beachten ist, daß jedes Plasma mit einem Anticoagulans gegen einen Leerwert (DFP-Zusatz) des gleichen Plasmas gemessen wurde: die Esterase-Aktivität im Oxalat-Plasma gegen einen solchen Leerwert, die Aktivität des Citrat-Plasmas gegen einen Citrat-Plasma enthaltenden Leerwert, u. s. f..

Wie erwähnt, wurden Plasma und Serum nicht von den übrigen Blutbestandteilen abgetrennt, sondern mit allen Zusätzen für die weiteren Versuche im Eisschrank aufbewahrt.

In der folgenden Tabelle 4 sind alle gemessenen Extinktionswerte des 1. Untersuchungstages (Tag der Blutentnahme) mit den verschiedenen Zusätzen angegeben.

Name	Nativ-Serum	NH_4-Oxalat	Anticoagulans K-Citrat	Na-Fluorid	Liquoid	Vetren
Wa	0,75	0,76	0,81	0,58	0,70	0,85
Ho	0,38	0,41	0,35	0,41	0,33	0,37
M	0,92	-	0,71	0,48	0,70	0,88
Wi	0,68	0,77	0,62	0,54	0,64	0,68
Op	0,46	0,46	0,39	0,35	0,42	-
He	0,66	0,75	0,64	0,46	0,65	0,75
Ka	0,25	0,27	0,23	-	0,26	0,27
B	0,81	1,20	1,00	0,66	1,04	1,12
A	0,60	0,66	0,62	0,60	0,66	0,66
Kr	0,58	0,56	0,48	0,38	0,54	0,58
Am	0,46	0,48	0,44	0,38	0,42	0,54
Hu	0,48	0,50	0,46	0,28	0,44	0,52
Si	0,54	0,56	0,52	0,42	0,52	0,56
Me	0,74	0,82	0,74	0,60	0,72	0,76
Sc	0,60	0,60	0,60	0,42	0,54	0,62

Tabelle 4: Ergebnisse des 1. Tages.
Gemessene Extinktionswerte.

Die, den Extinktionswerten entsprechenden, tatsächlichen Cholinesterase-Aktivitätswerte in o-Nitrophenol $\frac{(\mu\ Mol)}{(ml\ .\ min)}$ zeigt Tabelle 5.

Name	Nativ-Serum	Anticoagulans				
		NH_4-Oxalat	K-Citrat	Na-Fluorid	Liquoid	Vetren
Wa	1,55	1,57	1,68	1,19	1,44	1,76
Ho	0,77	0,82	0,70	0,82	0,65	0,73
M	1,91	-	1,47	0,98	1,44	1,82
Wi	1,39	1,60	1,27	1,11	1,32	1,39
Op	0,93	0,93	0,77	0,70	0,84	-
He	1,56	1,55	1,31	0,92	1,33	1,55
Ka	0,48	0,52	0,38	-	0,49	0,52
B	1,68	2,52	2,08	1,36	2,17	2,35
A	1,22	1,56	1,27	1,22	1,56	1,56
Kr	1,19	1,14	0,97	0,76	1,09	1,19
Am	0,93	0,97	0,88	0,76	0,84	1,09
Hu	0,97	1,09	0,92	0,54	0,88	1,06
Si	1,09	1,14	1,05	0,84	1,06	1,14
Me	1,54	1,70	1,53	1,22	1,49	1,57
Sc	1,22	1,22	1,22	0,84	1,09	1,27

Tabelle 5: Ergebnisse des 1. Tages. Cholinesterase-Aktivität in ($\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}}$) o-Nitrophenol.

In den Tabellen 6 und 7 sind die entsprechenden Werte des 2. Untersuchungstages zusammengestellt.

Name	Nativ-Serum	Anticoagulans				
		NH_4-Oxalat	K-Citrat	Na-Fluorid	Liquoid	Vetren
Wa	0,75	0,80	0,71	0,60	0,74	0,85
Ho	0,40	0,59	0,44	0,48	0,30	0,54
M	0,80	0,95	0,77	0,53	0,80	0,84
Wi	0,52	0,64	0,68	0,45	0,59	0,58
Op	0,47	0,38	0,35	0,33	0,41	-
He	0,66	0,68	0,54	0,49	0,55	0,62
Ka	0,30	0,26	0,23	-	0,26	0,26
B	1,08	1,20	1,08	0,76	1,10	1,24
A	0,60	0,66	0,60	0,62	0,60	0,66
Kr	0,48	0,58	0,46	0,38	0,52	0,60
Am	0,54	0,52	0,38	0,40	0,50	0,56
Hu	0,46	0,54	0,46	0,30	0,42	0,54
Si	0,46	0,52	0,68	0,42	0,64	0,56
Me	0,64	0,68	0,72	0,60	0,70	0,72
Sc	0,56	0,62	0,56	0,40	0,52	0,66

Tabelle 6: Ergebnisse des 2. Tages.
Gemessene Extinktionswerte.

Name	Nativ-Serum	Anticoagulans				
		NH_4-Oxalat	K-Citrat	Na-Fluorid	Liquoid	Vetren
Wa	1,55	1,66	1,46	1,22	1,52	1,76
Ho	0,79	1,20	0,88	0,97	0,58	1,09
M	1,66	1,98	1,58	1,08	1,66	1,74
Wi	1,05	1,31	1,39	0,90	1,20	1,18
Op	0,94	0,76	0,68	0,64	0,82	-
He	1,56	1,39	1,10	0,99	1,12	1,27
Ka	0,58	0,49	0,38	-	0,49	0,49
B	2,26	2,52	2,26	1,57	2,32	2,60
A	1,22	1,36	1,22	1,27	1,22	1,56
Kr	0,97	1,18	0,92	0,74	1,05	1,22
Am	0,98	1,06	0,74	0,79	1,01	1,14
Hu	0,92	0,98	0,92	0,58	0,84	0,98
Si	0,92	1,06	1,39	0,84	1,31	1,14
Me	1,31	1,39	1,48	1,22	1,44	1,48
Sc	1,14	1,27	1,14	0,79	1,05	1,56

Tabelle 7: Ergebnisse des 2. Tages.
Cholinesterase-Aktivität in ($\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}}$) o-Nitrophenol.

Die Ergebnisse des 4. Tages nach der Blutentnahme enthalten die Tabellen 8 und 9.

Name	Nativ-Serum	Anticoagulans				
		NH_4-Oxalat	K-Citrat	Na-Fluorid	Liquoid	Vetren
Ho	0,40	0,59	0,44	0,48	0,30	0,54
Wi	0,51	0,34	0,68	0,49	0,58	0,70
He	0,66	0,70	0,45	0,44	0,62	0,75
Ka	0,52	0,41	0,40	-	0,35	0,45
B	0,88	1,04	0,90	0,66	0,96	1,04
A	0,50	0,60	0,54	0,62	0,54	0,62
Hu	0,66	0,66	0,60	0,32	0,52	0,62
Op	0,41	0,42	0,31	0,28	0,37	0,48
Kr	0,50	0,57	0,40	0,38	0,46	0,49
Am	0,51	0,47	0,42	0,39	0,47	0,51

Tabelle 8: Ergebnisse des 4. Tages.
Gemessene Extinktionswerte.

Name	Nativ-Serum	Anticoagulans				
		NH_4-Oxalat	K-Citrat	Na-Fluorid	Liquoid	Vetren
Ho	0,79	1,20	0,88	0,97	0,58	1,09
Wi	1,03	0,67	1,39	1,00	1,19	1,44
He	1,35	1,44	0,90	0,88	1,27	1,55
Ka	1,05	0,82	0,79	-	0,68	0,90
B	1,82	2,18	1,87	1,36	2,00	2,18
A	1,01	1,22	1,15	1,27	1,10	1,27
Hu	1,35	1,35	1,22	0,71	1,06	1,27
Op	0,82	0,84	0,60	0,54	0,73	0,97
Kr	1,01	1,16	0,79	0,74	0,93	1,00
Am	1,03	0,95	0,84	0,77	0,95	1,03

Tabelle 9: Ergebnisse des 4. Tages.
Cholinesterase-Aktivität in ($\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}}$) o-Nitrophenol

Die Tabellen 10 und 11 zeigen die Werte des 7. Tages nach der Blutentnahme; die Tabellen 12 und 13 diejenigen des 14. Tages; die Tabellen 14 und 15 die Werte des 21. Tages und die Tabellen 16 und 17 die Werte des 28. Tages nach der Blutentnahme.

Name	Nativ-Serum	Anticoagulans				
		NH_4-Oxalat	K-Citrat	Na-Fluorid	Liquoid	Vetren
Ho	0,44	0,38	0,34	0,35	0,42	0,45
Wi	0,68	0,48	0,60	0,56	0,64	0,68
Op	0,33	-	0,21	0,23	0,28	0,48
He	0,64	0,66	0,52	0,50	0,64	0,72
Ka	0,41	0,29	0,29	-	0,28	0,38
B	0,76	1,08	0,88	0,64	0,92	0,92
A	0,34	0,38	0,38	0,48	0,38	0,38
Kr	0,46	-	0,28	0,38	0,34	0,30
Am	0,54	0,42	0,46	0,40	0,50	0,44
Hu	0,60	0,60	0,60	0,46	0,42	0,48

Tabelle 10: Ergebnisse des 7. Tages
Gemessene Extinktionswerte

Name	Nativ-Serum	Anticoagulans				
		NH_4-Oxalat	K-Citrat	Na-Fluorid	Liquoid	Vetren
Ho	0,88	0,76	0,66	0,70	0,84	0,90
Wi	1,39	0,97	1,22	1,14	1,32	1,39
Op	0,64	-	0,38	0,43	0,54	0,97
He	1,30	1,36	1,05	1,01	1,30	1,47
Ka	0,82	0,57	0,57	-	0,54	0,76
B	1,57	2,28	1,84	1,30	1,91	1,91
A	0,66	0,76	0,76	0,97	0,76	0,76
Kr	0,93	-	0,54	0,76	0,66	0,58
Am	1,09	0,84	0,93	0,79	1,01	0,88
Hu	1,22	1,22	1,22	0,93	0,84	0,97

Tabelle 11: Ergebnisse des 7. Tages.
Cholinesterase-Aktivität in ($\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}}$) o-Nitrophenol.

Name	Nativ-Serum	Anticoagulans				
		NH_4-Oxalat	K-Citrat	Na-Fluorid	Liquoid	Vetren
Wi	0,60	0,39	0,68	0,58	0,64	0,68
He	0,54	0,43	0,30	0,53	0,73	0,66
Ka	0,32	0,23	0,27	-	0,31	0,35
B	0,52	1,22	1,04	0,76	1,04	0,98
Me	-	-	-	-	-	-

Tabelle 12: Ergebnisse des 14. Tages.
Gemessene Extinktionswerte.

Name	Nativ-Serum	Anticoagulans				
		NH_4-Oxalat	K-Citrat	Na-Fluorid	Liquoid	Vetren
Wi	1,22	0,77	,139	1,18	1,30	1,39
He	1,09	0,85	0,58	1,08	1,50	1,56
Ka	0,63	0,43	0,52	-	0,60	0,69
B	1,05	2,56	2,18	1,57	2,18	2,04
Me	-	-	-	-	-	-

Tabelle 13: Ergebnisse des 14. Tages.
Cholinesterase-Aktivität in $(\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}})$ -o-Nitrophenol.

Name	Nativ-Serum	Anticoagulans				
		NH_4-Oxalat	K-Citrat	Na-Fluorid	Liquoid	Vetren
Wi	0,62	0,29	0,58	0,50	0,65	0,67
He	0,60	0,43	0,23	0,47	0,68	0,68
Ka	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-
Me	0,74	0,82	-	0,44	0,80	0,75

Tabelle 14: Ergebnisse des 21. Tages.
Gemessene Extinktionswerte.

Name	Nativ-Serum	Anticoagulans				
		NH_4-Oxalat	K-Citrat	Na-Fluorid	Liquoid	Vetren
Wi	1,27	0,57	1,18	1,01	1,32	1,68
He	1,22	0,85	0,43	0,95	1,39	1,39
Ka	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-
Me	1,52	1,70	-	0,88	1,66	1,55

Tabelle 15: Ergebnisse des 21. Tages.
Cholinesterase-Aktivität in ($\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}}$) o-Nitrophenol.

Name	Nativ-Serum	Anticoagulans				
		NH_4-Oxalat	K-Citrat	Na-Fluorid	Liquoid	Vetren
Wi	0,41	0,24	0,38	0,47	0,58	0,60
He	0,27	0,46	0,12	0,52	0,52	0,59
Ka	-	-	-	-	-	-
B	-	1,16	1,04	0,88	1,12	0,92
Me	0,68	0,60	0,60	0,58	0,68	0,85

Tabelle 16: Ergebnisse des 28. Tages.
Gemessene Extinktionswerte.

Name	Nativ-Serum	Anticoagulans NH_4-Oxalat	K-Citrat	Na-Fluorid	Liquoid	Vetren
Wi	0,82	0,46	0,75	0,85	1,18	1,22
He	0,52	0,92	0,07	1,05	1,05	1,20
Ka	-	-	-	-	-	-
B	-	2,44	2,18	1,83	2,34	1,91
Me	1,39	1,22	1,22	1,18	1,39	1,76

Tabelle 17: Ergebnisse des 28. Tages. Cholinesterase-Aktivität in $(\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}})$ o-Nitrophenol.

3. Ergebnisse:

a) Graphische Darstellung der positiven und negativen Abweichungen vom Nativwert

Für alle ermittelten Cholinesterase-Aktivitätswerte bei den verschiedenen Anticoagulantien wurden nun die täglichen Abweichungen vom Nativwert errechnet. Die Abbildungen 4 - 18 zeigen diese Abweichung, angegeben in den o-Nitrophenol-Werten in $(\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}})$. Die Null-Linie entspricht dem täglichen Wert des Nativ-Serums, die positiven und negativen Werte sind die entsprechende Differenz der die Zusätze enthaltenden Plasmen. Die Abbildungen 4 - 18 geben die Ergebnisse von 15 untersuchten Personen wieder.

Die Abbildungen 4 - 6 zeigen Ergebnisse bis zum 28. Tag nach der Blutentnahme.

Die Abbildungen 7 - 8 zeigen Ergebnisse bis zum 14. Tag nach der Blutentnahme.

Die Abbildungen 9 - 14 zeigen Ergebnisse bis zum 7. Tag nach der Blutentnahme.

Die Abbildungen 15 - 18 zeigen Ergebnisse bis zum 2. Tag nach der Blutentnahme.

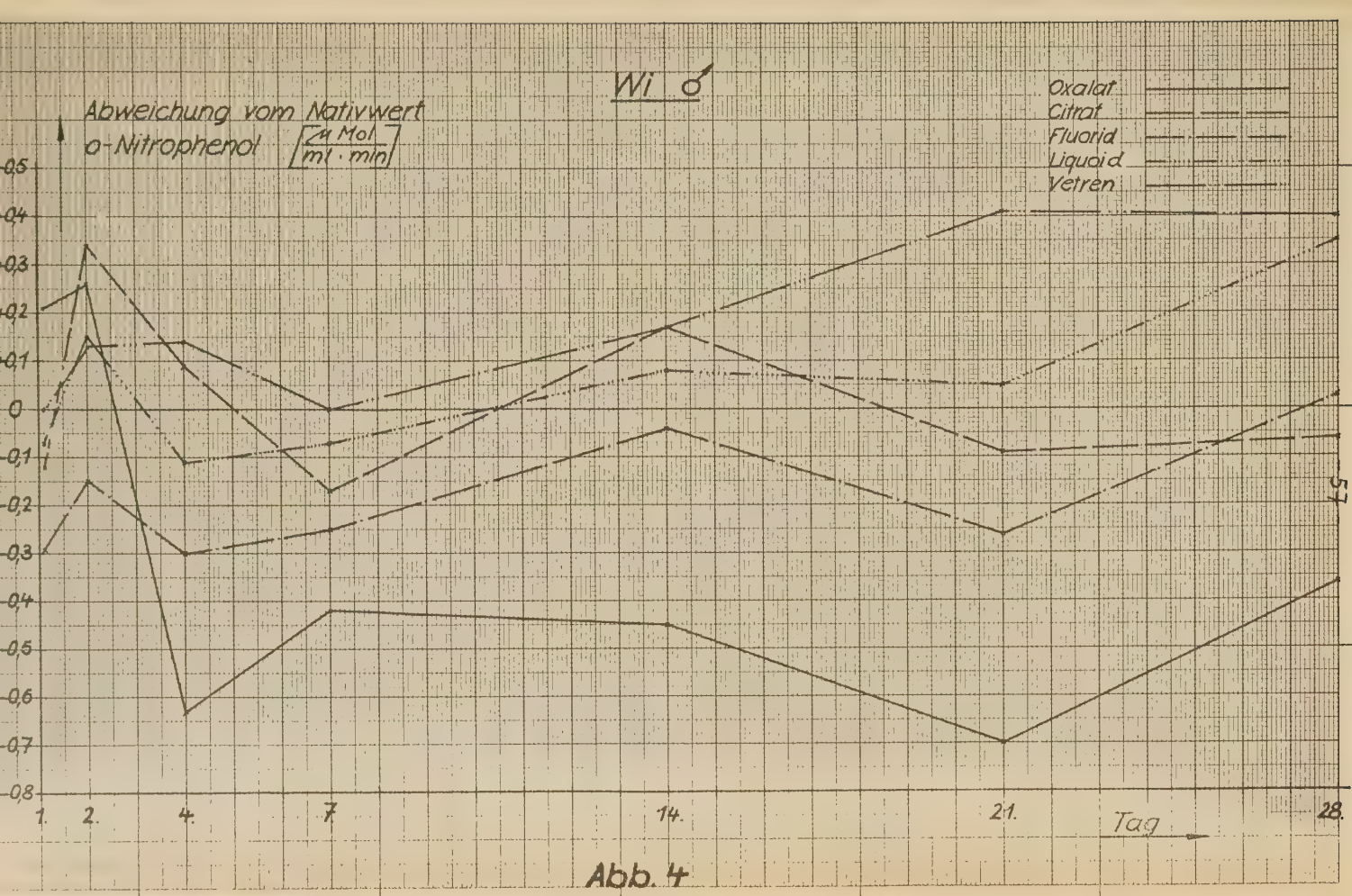

Wi ♂
Abweichung vom Nativwert
o-Nitrophenol [µ Mol / ml · min]
Oxalat
Citrat
Fluorid
Liquoid
Vetren
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
-0,1
-0,2
-0,3
-0,4
-0,5
-0,6
-0,7
-0,8
1.
2.
4.
7.
14.
21.
28.
Tag
57

Abb. 4

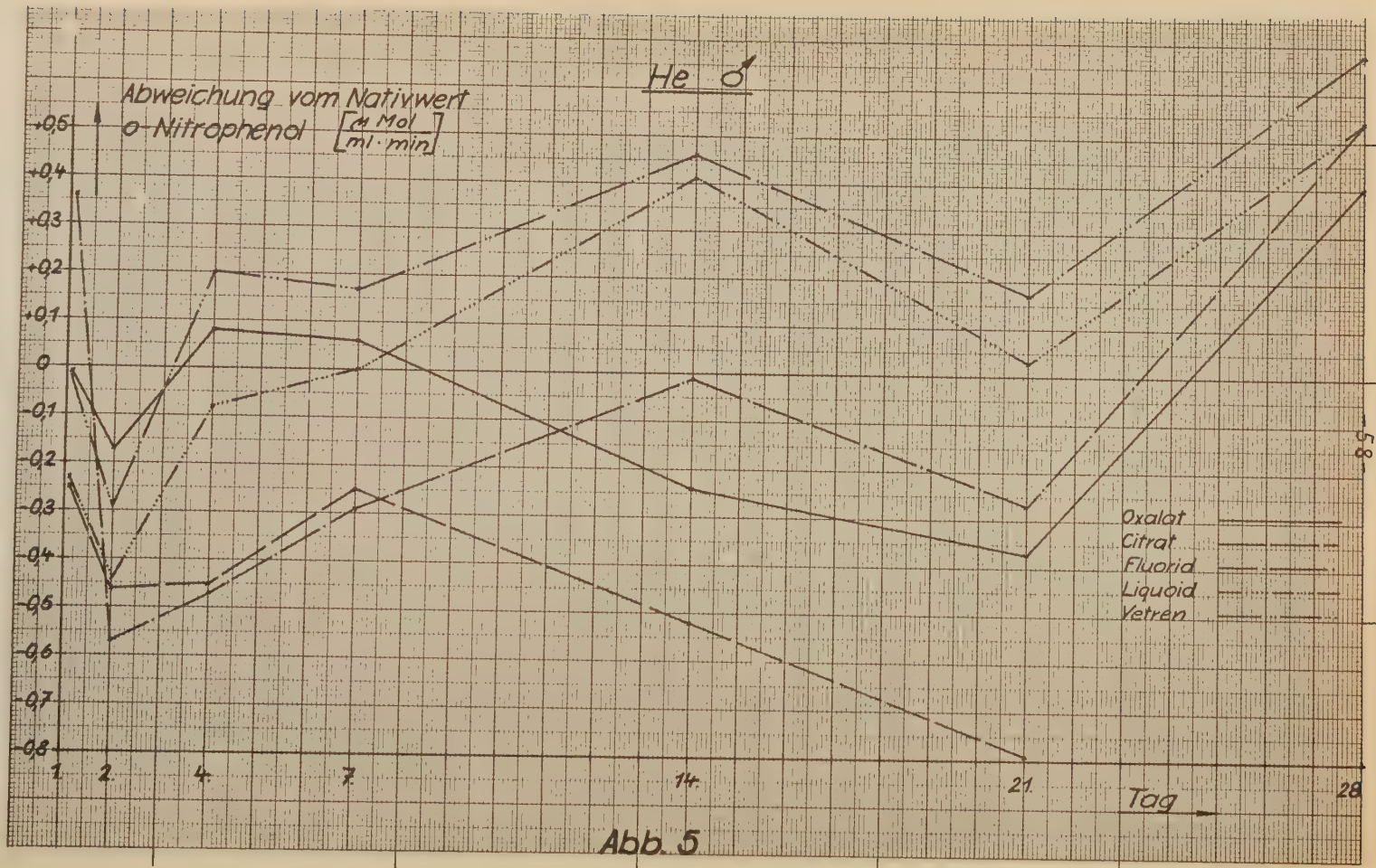
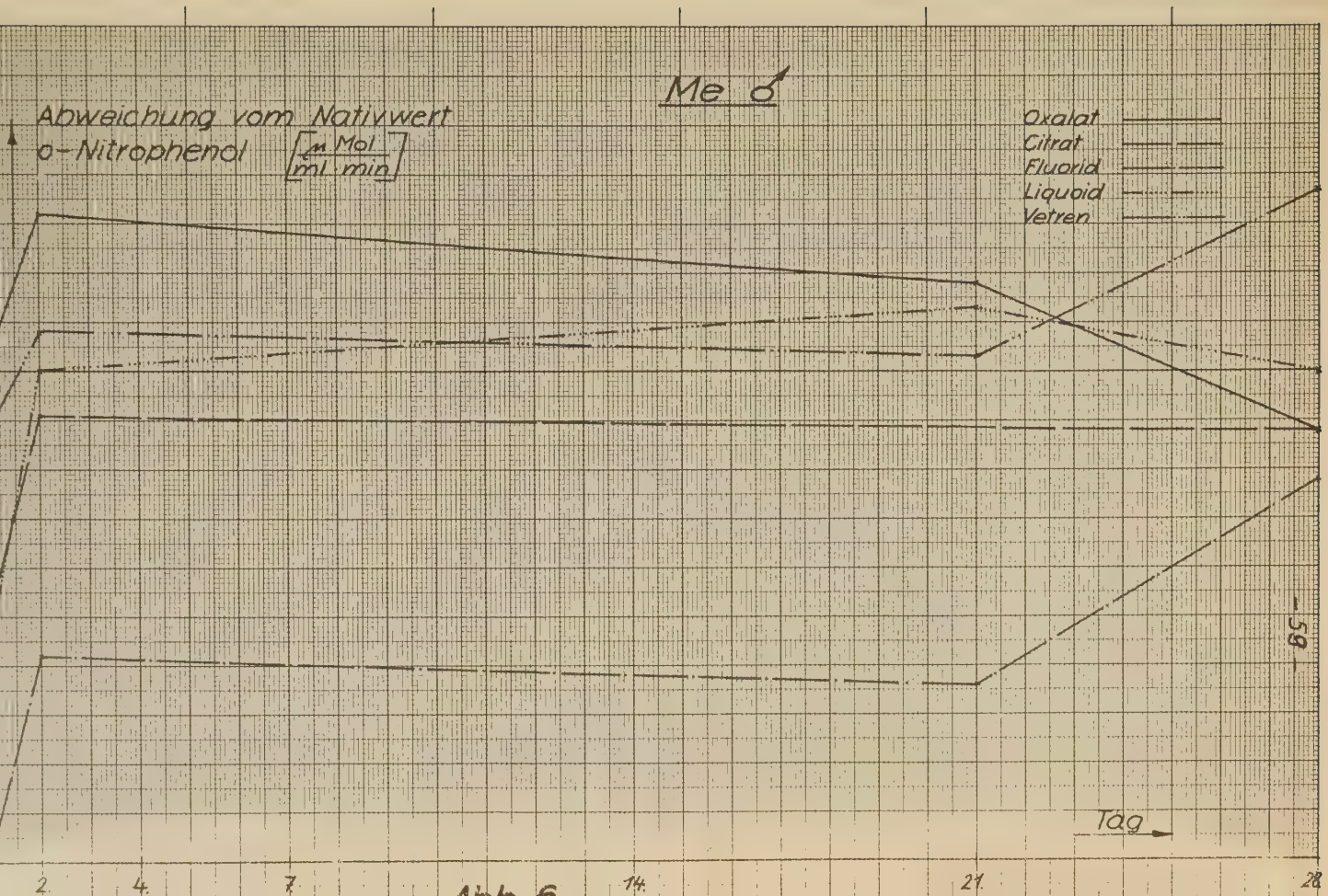
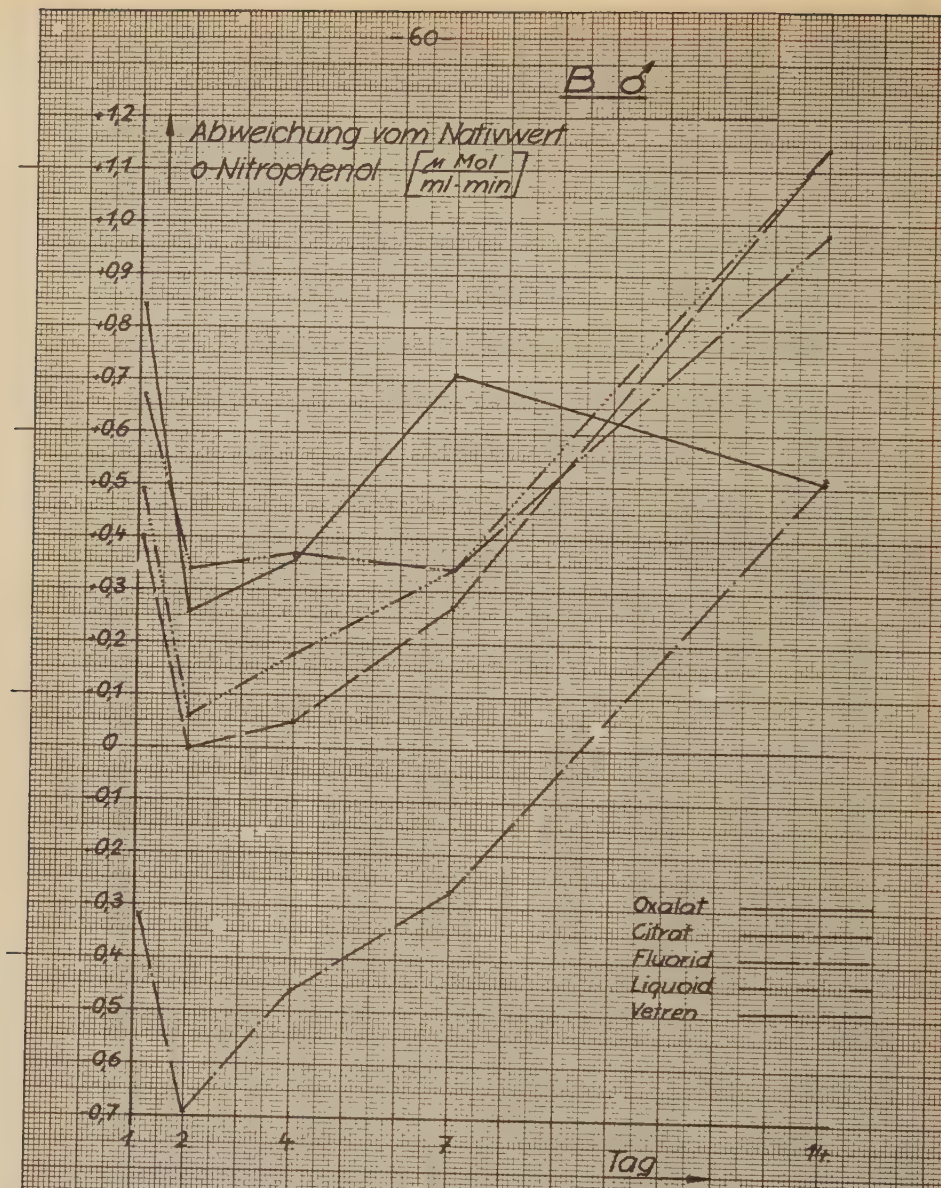

He ♂
Abweichung vom Nativwert
o-Nitrophenol [cm Mol / ml · min]
+0,5
+0,4
+0,3
+0,2
+0,1
0
-0,1
-0,2
-0,3
-0,4
-0,5
-0,6
-0,7
-0,8
1
2
4
7
14
21
28
Tag
Oxalat
Citrat
Fluorid
Liquoid
Vetren
-89-

Abb. 5


Me ♂
Abweichung vom Nativwert
o-Nitrophenol [n Mol / ml min]
Oxalat
Citrat
Fluorid
Liquoid
Vetren
Tag
2
4
7
14
21
28
- 59 -



Nativ-Serum ging nach 14 Tagen zugrunde

Abb. 7

Ka ♀

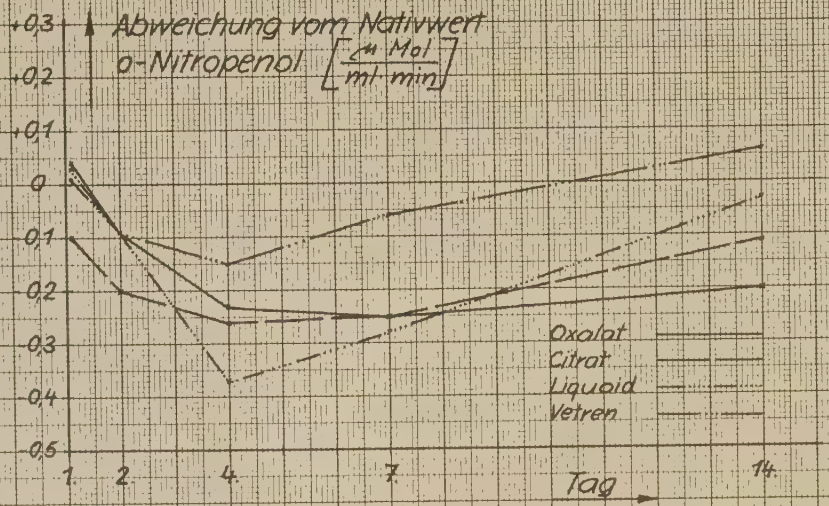

+0,3
+0,2
+0,1
0
-0,1
-0,2
-0,3
-0,4
-0,5
Abweichung vom Nativwert
o-Nitrophenol [cm Mol / ml min]
1
2
4
7
14
Tag
Oxalat
Citrat
Liquoid
Vetren

Abb. 8

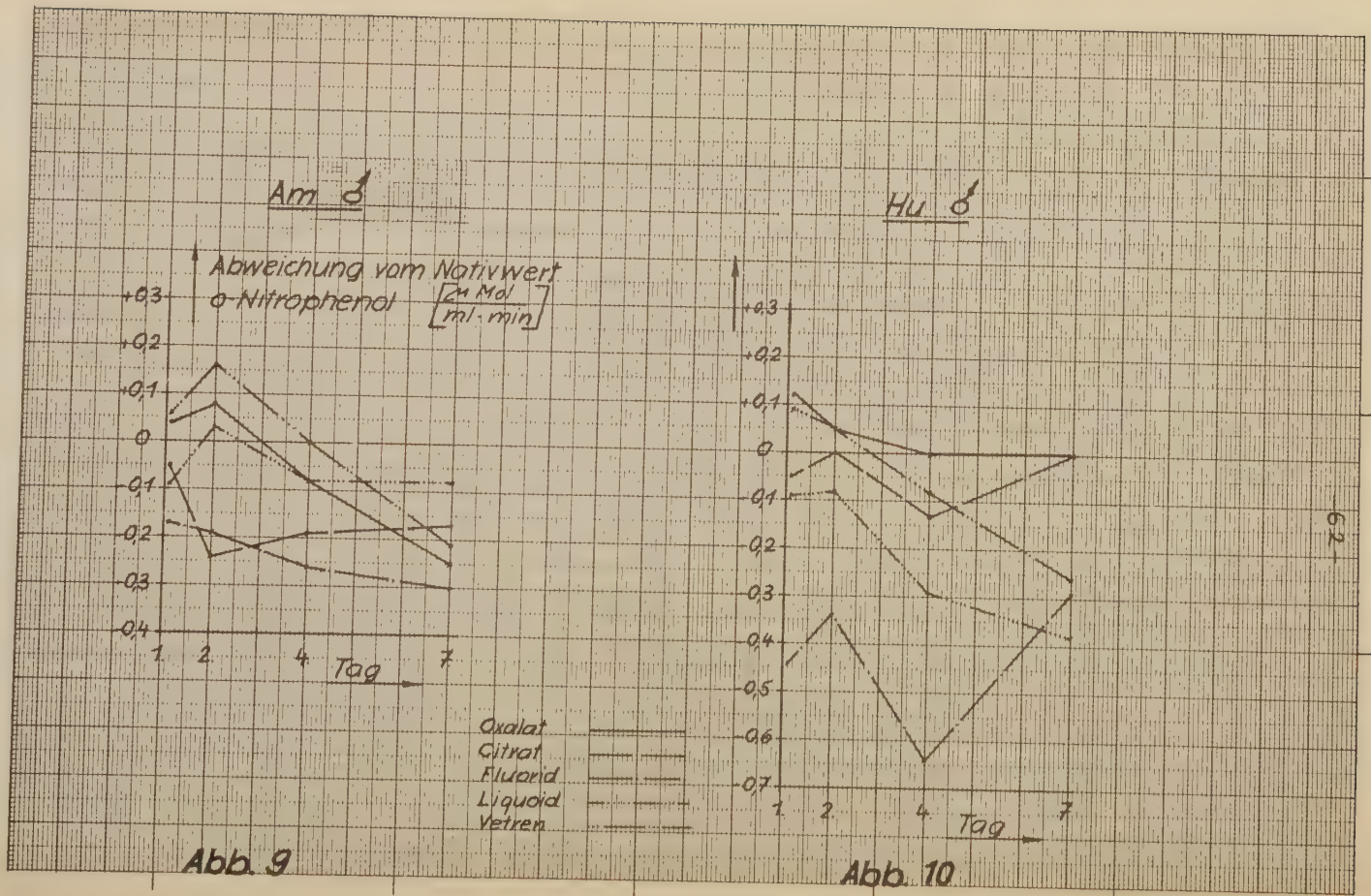

Am ♂
Abweichung vom Nativwert
o-Nitrophenol [µMol / ml · min]
+0,3
+0,2
+0,1
0
-0,1
-0,2
-0,3
-0,4
1
2
4
7
Tag
Oxalat
Citrat
Fluorid
Liquoid
Vetrem
Hu ♂
+0,3
+0,2
+0,1
0
-0,1
-0,2
-0,3
-0,4
-0,5
-0,6
-0,7
1
2
4
7
Tag

Abb. 9

Abb. 10

Abweichung vom Nativwert
o-Nitrophenol $\left[\frac{\mu Mol}{ml \cdot min}\right]$

Op ♂

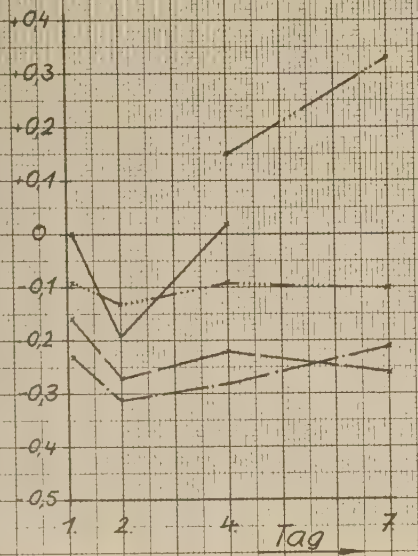


Abb. 11

Kr ♀

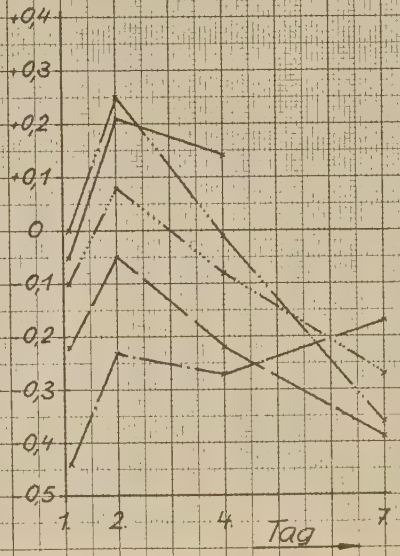


Abb. 12

A ♂

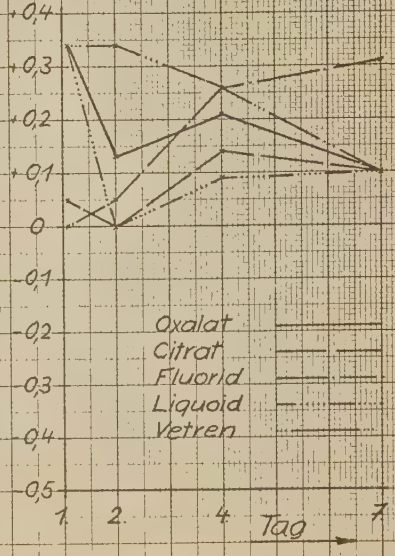


Abb. 13

Ho ♂

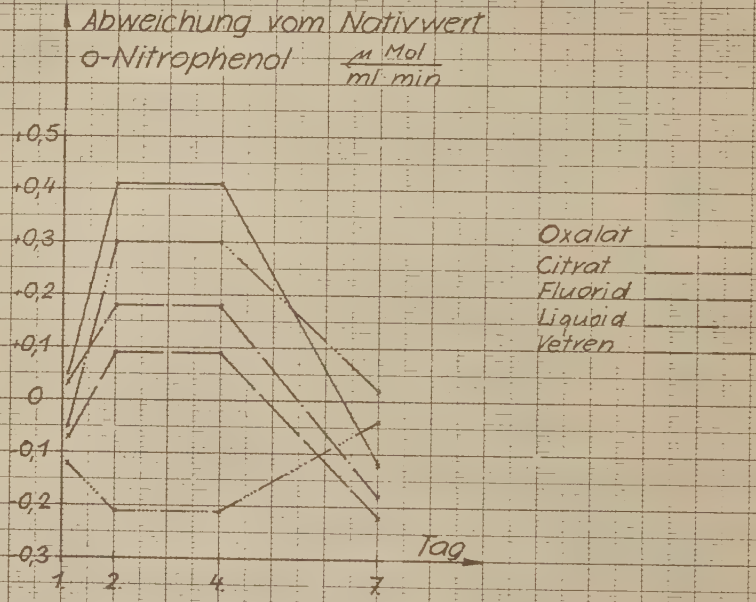

Abweichung vom Nativwert
o-Nitrophenol
µ Mol / ml min
+0,5
+0,4
+0,3
+0,2
+0,1
0
-0,1
-0,2
-0,3
1
2
4
7
Tag
Oxalat
Citrat
Fluorid
Liquoid
Vetren

Abb. 14

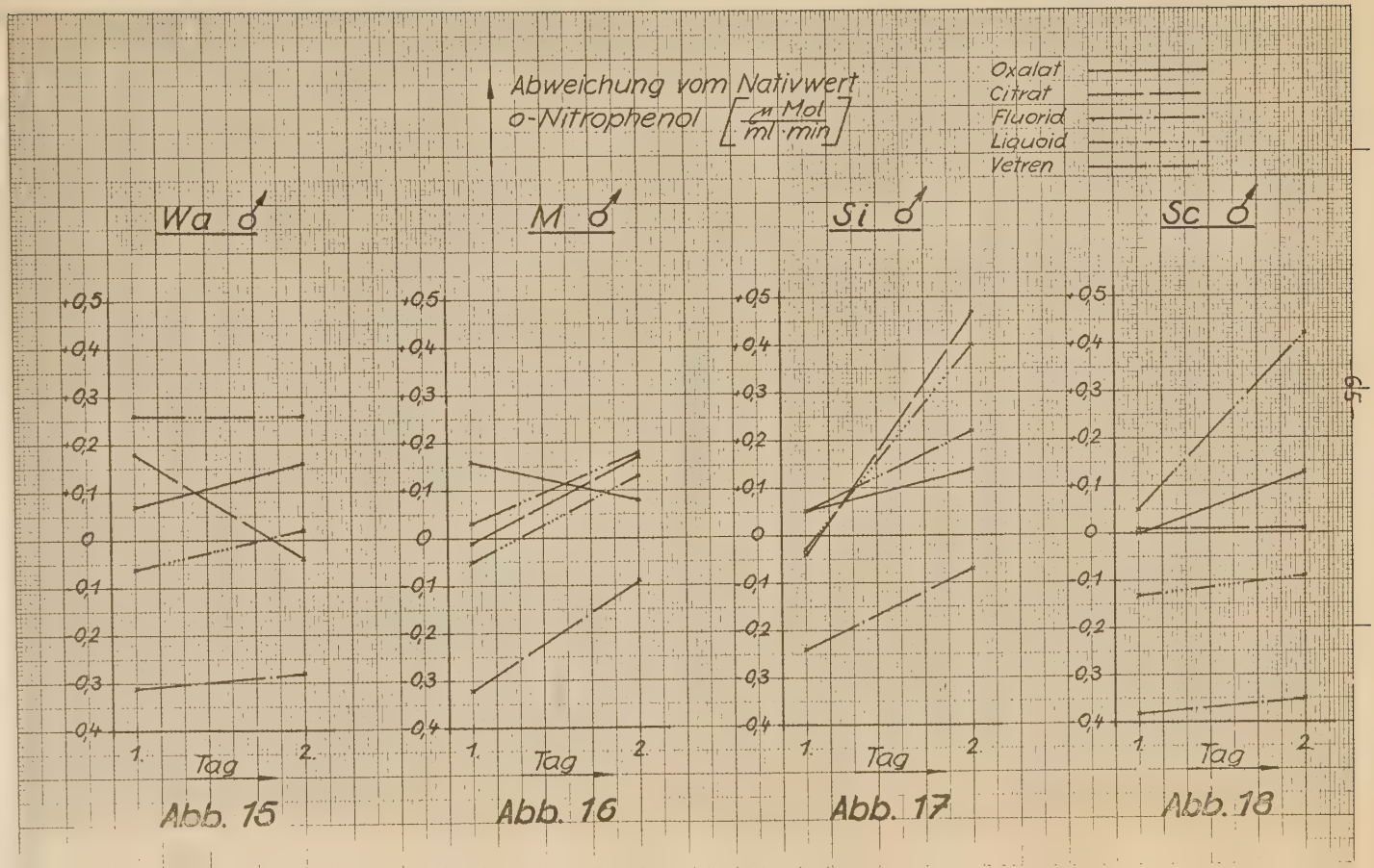


Abb. 15 Abb. 16 Abb. 17 Abb. 18

b) Aufgliederung nach den gerinnungshemmenden Zusätzen

Diese Differenzen zwischen dem für das Serum ohne Zusatz gewonnenen Wert und den mit den verschiedenen Anticoagulantien versetzten Plasmen schwanken in den Extremen zwischen Null und 130 %. Zur Beurteilung der Methode wurden die Abweichungen in 4 Gruppen, die Differenzen von 0 - 9 %, 10 - 19 %, 20 - 29 % und über 30 % eingeteilt. Ohne Beachtung blieb, ob es sich um positive oder negative Werte handelt. In den Tabellen 18 - 22 sind die Abweichungen vom Nativwert bei den verschiedenen Seren aufgeführt. Die Werte sind als Anzahl der Fälle in % angegeben.

Tabelle 18: Oxalat-Plasma

Tage	1.	2.	4.	7.	14.	21.	28.
Gesamtzahl der Fälle	15	15	10	8	4	3	3
Abweichung vom Nativwert	Anzahl der Fälle in %						
0 - 9 %	67	20	40	25	-	-	33
10 - 19 %	20	53	10	25	-	33	33
20 - 29 %	6	20	30	12	25	-	-
über 30 %	6	6	20	38	75	66	33

Tabelle 19: Citrat-Plasma

Tage	1.	2.	4.	7.	14.	21.	28.
Gesamtzahl der Fälle	15	15	10	10	4	2	2
Abweichung vom Nativwert	Anzahl der Fälle in %						
0 - 9 %	53	47	30	10	-	50	100
10 - 19 %	27	13	30	50	50	-	-
20 - 29 %	20	13	30	10	-	-	-
über 30 %	-	27	10	30	50	50	-

Tabelle 20: Fluorid-Plasma

Tage	1.	2.	4.	7.	14.	21.	28.
Gesamtzahl der Fälle	14	14	9	9	3	3	3
Abweichung vom Nativwert	Anzahl der Fälle in %						
0 - 9 %	14	21	-	-	67	-	33
10 - 19 %	14	21	-	33	-	-	33
20 - 29 %	50	14	66	44	-	67	-
über 30 %	22	44	33	22	33	33	33

Tabelle 21: Liquoid-Plasma

Tage	1.	2.	4.	7.	14.	21.	28.
Gesamtzahl der Fälle	15	15	10	10	4	3	3
Abweichung vom Nativwert	Anzahl der Fälle in %						
0 - 9 %	47	53	50	40	50	100	33
10 - 19 %	33	27	20	20	-	-	-
20 - 29 %	13	13	20	20	-	-	-
über 30 %	7	7	10	20	50	-	66

Tabelle 22: Vetren-Plasma

Tage	1.	2.	4.	7.	14.	21.	28.
Gesamtzahl der Fälle	14	14	10	10	4	3	3
Abweichung vom Nativwert	Anzahl der Fälle in %						
0 - 9 %	79	14	30	30	-	33	-
10 - 19 %	7	50	40	30	50	33	-
20 - 29 %	7	22	20	20	-	-	33
über 30 %	7	14	10	20	50	33	66

c) Aufgliederung nach den einzelnen Untersuchungstagen

Nachdem für jedes einzelne Anticoagulans der Einfluß auf die Cholinesterase-Aktivität, die mit der o-Nitrophenylbutyrat-Methode bestimmt wurde, ermittelt war,

wird in einer weiteren Zusammenstellung für jeden Tag der Untersuchungen die Abweichung der Werte bei Anwendung der verschiedenen Zusatzmittel dargestellt.

Tabelle 23:

1. Tag	Anzahl der Fälle in %				
% der Abweichung	Oxalat	Citrat	Fluorid	Liquoid	Vetren
0 - 9	67	53	14	47	79
10 - 19	20	27	14	33	7
20 - 29	6	20	50	13	7
über 30	6	-	22	7	7

Tabelle 24:

2. Tag	Anzahl der Fälle in %				
% der Abweichung	Oxalat	Citrat	Fluorid	Liquoid	Vetren
0 - 9	20	47	21	53	14
10 - 19	53	13	21	27	50
20 - 29	20	13	14	13	22
über 30	6	27	44	7	14

Tabelle 25:

4. Tag	Anzahl der Fälle in %				
% der Abweichung	Oxalat	Citrat	Fluorid	Liquoid	Vetren
0 - 9	40	30	-	50	30
10 - 19	10	30	-	20	40
20 - 29	30	30	66	20	20
über 30	20	10	33	10	10

Tabelle 26:

7. Tag	Anzahl der Fälle in %				
% der Abweichung	Oxalat	Citrat	Fluorid	Liquoid	Vetren
0 - 9	25	10	-	40	30
10 - 19	25	50	33	20	30
20 - 29	12	10	44	20	20
über 30	38	30	22	20	20

Tabelle 27:

14. Tag	Anzahl der Fälle in %				
% der Abweichung	Oxalat	Citrat	Fluorid	Liquoid	Vetren
0 - 9	-	-	67	50	-
10 - 19	-	50	-	-	50
20 - 29	25	-	-	-	-
über 30	75	50	33	50	50

Tabelle 28:

21. Tag	Anzahl der Fälle in %				
% der Abweichung	Oxalat	Citrat	Fluorid	Liquoid	Vetren
0 - 9	-	50	-	100	33
10 - 19	33	-	-	-	33
20 - 29	-	-	67	-	-
über 30	66	50	33	-	33

Tabelle 29:

28. Tag	Anzahl der Fälle in %				
% der Abweichung	Oxalat	Citrat	Fluorid	Liquoid	Vetren
0 - 9	33	100	33	33	-
10 - 19	33	-	33	-	-
20 - 29	-	-	-	-	33
über 30	33	-	33	66	66

Abweichungen von 30 - 80 % fanden sich:

vom 1. - 28. Tag bei Oxalat-Zusatz insgesamt 13 Mal
vom 2. - 21. Tag bei Citrat-Zusatz insgesamt 10 Mal
vom 1. - 21. Tag bei Fluorid-Zusatz insgesamt 16 Mal
vom 1. - 28. Tag bei Liquoid-Zusatz insgesamt 7 Mal
vom 1. - 28. Tag bei Vetren-Zusatz insgesamt 9 Mal

Die größten Abweichungen betrugen:

am 14. Tag bei Citrat-Zusatz + 108 %
am 28. Tag bei Fluorid-Zusatz + 100 %
am 14. Tag bei Liquoid-Zusatz + 108 %
am 28. Tag bei Liquoid-Zusatz + 100 %
am 14. Tag bei Vetren-Zusatz + 93 %
am 28. Tag bei Vetren-Zusatz + 130 %.

III. Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität nach Hemmung mit einem Alkylphosphat

Versuche mit Isosystox-Sulfoxyd:

Von einer Isosystox-Sulfoxyd-Lösung wurden 0,027 ml in 100 ml Butanol-Phosphat-Puffer gebracht, so daß die Konzentration 10^{-3} M war. Von diesem Gemisch wurden 5 ml einem Ansatz zur Cholinesterase-Bestimmung nach der o-Nitrophenylbutyrat-Methode zugefügt. Gegen einen Leerwert gemessen, zeigte sich eine völlige Hemmung der Cholinesterase-Aktivität im Vergleich zu dem Ergebnis ohne Isosystox-Zusatz.

Durch Verdünnen wurde aus dieser 10^{-3} M Isosystox-Sulfoxyd-Lösung in Puffer eine 10^{-4} M Lösung hergestellt. Nun wurde diese zu den Versuchen verwendet. Die 10^{-4} M Konzentration des Isosystox-Sulfoxyds bewirkte bei dem Nativ-Serum und bei den mit einem Anticoagulans versehenen Plasma eine Hemmung der Extinktion und damit der Esterase-Aktivität um etwa die Hälfte des Wertes.

Versuche mit Blut von 2 Personen (A und B):

	Nativ	Oxalat	Citrat	Fluorid	Liquoid	Vetren	
A	0,64	0,68	0,72	0,60	0,70	0,72	ohne
	0,36	0,39	0,35	0,38	0,37	0,39	mit
B	0,56	0,62	0,56	0,40	0,52	0,66	ohne
	0,30	0,30	0,31	0,26	0,29	0,33	mit

Tabelle 30: Gemessene Extinktionswerte, mit und ohne Zusatz von Isosystox-Sulfoxyd, bei zwei Versuchsreihen

Arbeitete man mit einem 10^{-5} M Isosystox-Sulfoxyd-Puffer, so ergab sich nur noch eine sehr geringe Erniedrigung der Extinktion.

IV. Reaktivierungsversuche mit PAM (Pyridin-Aldoxim-Methjodid)

Entsprechend den Arbeiten von Friedberg und Sakai (14) sollte versucht werden, durch Alkylphosphat gehemmte Cholinesterasen mit PAM zu reaktivieren.

Für diese Versuche wurden die gleichen Reagentien wie beschrieben verwendet. Zur Reaktivierung wurde eine Lösung benützt, die 10 mg PAM in 10 ml Wasser enthielt.

In Vorversuchen ergab sich, daß nach Hinzufügen von PAM zu dem Analysenansatz teilweise sehr viel höhere Extinktionen gemessen wurden, als durch das betreffende Serum vor Reaktivierung und Vergiftung zu erhalten waren.

Deshalb wurde in ein Reagenzglas mit 5 ml Substrat-Pufferlösung 1 ml (enthaltend 1 mg PAM) der PAM-Lösung gebracht. Sofort nach Zugabe der PAM-Lösung färbte sich der Reaktionsansatz gelb, ohne daß überhaupt die Serumverdünnung zu dem Gemisch gegeben wurde. Die wässrige PAM-Lösung sowie die Puffersubstratlösung waren alleine praktisch ungefärbt.

Dieses Ergebnis legte den Gedanken nahe, daß PAM allein in der Lage sein könne, aus o-Nitrophenylbutyrat eine gelbgefärbte Verbindung, möglicherweise o-Nitrophenol, in Freiheit zu setzen.

Um diese Frage zu klären, wurden eine Reihe weiterer Un-

tersuchungen durchgeführt.

Die beim Zusammengeben von o-Nitrophenylbutyrat in Puffer und wässriger PAM-Lösung entstandene gelbgefärbte Lösung besaß ein Absorptionsmaximum bei 420 mμ. Dasselbe Maximum wies ein Reaktionsansatz auf, bei dem in der bereits früher beschriebenen Weise die Cholinesterase eines Normalserums o-Nitrophenol aus dem o-Nitrophenylbuttersäureester abgespalten hatte.

Dünnschichtchromatographische Untersuchung:

Da es sich bei der gelbgefärbten Verbindung, die bei der Einwirkung von PAM auf o-Nitrophenylbutyrat entstanden war, vermutlich um o-Nitrophenol handelte, mußte ein dünnschichtchromatographisches Verfahren ausgearbeitet werden, das o-Nitrophenol neben o-Nitrophenylbutyrat nachzuweisen erlaubte.

Als Plattenmaterial wurde Kieselgel Merck verwendet. An Laufmittelgemischen wurden geprüft: Aethylacetat, Hexan, Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Chloroform, Aether, Aethanol, Methanol, Aethanol-Wasser 4 : 3, Methanol-Methylenchlorid 3 : 8, 2,2 - Dichloraethylaether, Epichlorhydrin, Toluol-Aceton 9 : 1 und Aceton.

Die Entwicklung erfolgte durch Besprühen mit 2 n NH_4OH, wobei sich o-Nitrophenol stark gelb, der Ester zunächst schwach gelb und zunehmend stärker werdend anfärbte. In keinem Falle konnten Unterschiede im Rf-Wert der beiden Substanzen festgestellt werden.

Dagegen konnte eine gute Auftrennung mit Toluol als Lauf-

mittel erreicht werden. Die Rf-Werte betrugen hier für o-Nitrophenol 0,49, für o-Nitrophenylbutyrat 0,28, die Laufzeit 40 Minuten.

Sodann wurden folgende Ansätze hergestellt:

I. 5 ml Substrat-Puffer + 1 ml H_2O.
II. 5 ml Substrat-Puffer + 1 mg PAM in 1 ml H_2O.

Die Ansätze wurden 1/2 Stunde bei 25 ^{o} C gehalten, sodann mit Salzsäure angesäuert und mit 2 ml Aether ausgeaethert. Von der Aetherphase wurden aliquote Teile dünnschichtchromatographisch untersucht. Hierbei ergab sich, daß im Ansatz I praktisch nur o-Nitrophenylbutyrat neben einer außerordentlich kleinen Menge o-Nitrophenol vorhanden war. Ansatz II (mit PAM) hingegen enthielt neben o-Nitrophenylbutyrat deutlich eine wesentlich größere Menge o-Nitrophenol. Praktisch dasselbe Ergebnis wurde auch erhalten, wenn die beiden Ansätze zwei Stunden bzw. über Nacht bei 25 ^{o} C gehalten worden waren.

Die Ergebnisse der spektrophotometrischen und der dünnschichtchromatographischen Untersuchung machen es sehr wahrscheinlich, daß PAM in der Lage ist, aus o-Nitrophenylbutyrat o-Nitrophenol abzuspalten.

Die Spaltung von o-Nitrophenylbutyrat durch PAM ist kein vereinzelt dastehendes Phänomen. Es ist bekannt, daß z. B. die Hydrolyse von Organophosphaten durch zahlreiche Verbindungen, insbesondere stickstoffhaltige, katalysiert werden kann. Aüsführliche Untersuchungen liegen über die Hydrolyse von DFP vor, die z. B. durch Benzohydroxamsäure, Nikotinhydroxamsäure sowie deren Methjodid,

durch Pikolinhydroxamsäure und Isonikotinhydroxamsäure katalytisch z. T. sehr stark beschleunigt werden kann (Hackley, Plapinger, Stollberg und Wagner-Jauregg 1955 (21)); zusammenstellung zu diesem Problem veröffentlichten Arbeiten siehe auch O'Brien (1960).

Diese Reaktionen sind besonders interessant, da PAM in der Lage ist, durch Alkylphosphate vergiftete Cholinesterase zu reaktivieren (vergleiche z. B. Wilson, Ginsburg und Meislich 1955 (65)).

Wagner-Jauregg und Hackley 1953 (63) nehmen an, daß die Hydrolyse von DFP und Diisopropylfluorphosphat durch Imidazol, Histidin, Pyridin und einige Derivate dieser Verbindungen katalytisch beschleunigt wird, wobei zunächst ein intermediärer Komplex zwischen der stickstoffhaltigen Verbindung und dem Dialkylfluorphosphat gebildet wird, der dann sekundär zerfällt.

Green und Saville 1956 (19) untersuchten sehr gründlich die beschleunigte Hydrolyse von Sarin (Isopropylmethylfluorphosphat) in Gegenwart verschiedener Oxime in praktisch neutraler Lösung. Sie stellen fest, daß für jedes gespaltene Mol Sarin ein Mol Oxim verbraucht wurde. Für jedes verbrauchte Mol Oxim wurde 1 Mol Carboxylsäure gebildet.

Daneben untersuchten sie auch - was für die mögliche Spaltung von o-Nitrophenylbutyrat + PAM besonders interessant ist - die Spaltung von Essigsäureanhydrid durch Hydroxyiminaceton in neutraler Lösung. Sie stellen eine praktisch sofort einsetzende Spaltung mit Freisetzung eines einzelnen Mols Säure pro Katalysatormoleküls fest. Daneben zerfiel auch der Essigsäure-Katalysator-Komplex, aller-

dings erforderte dies eine längere Zeit.

Hackley, Stollberg, Plapinger und Wagner-Jauregg 1955 (21) fanden, daß bei Hydrolyse von 1 Mol DFP in Gegenwart verschiedener Hydroxamsäuren 1,5 bis 2 Mol der letzteren aus dem Reaktionsansatz verschwanken. Dies deuteten die Autoren so, daß die Hydroxamsäuren nicht als echte Katalysatoren die Hydrolyse-Reaktion beschleunigen, sondern selbst hierbei verändert werden.

Das Reaktionsprodukt zwischen DFP bzw. Sarin und Bezohydroxamsäure wurde isoliert und als O-Phenylcarbamylbenzohydroxamat $C_6H_5CONHOCONHC_6H_5$ identifiziert. Für den Reaktionsablauf geben die Autoren die folgenden Gleichungen an:

$$C_6H_5CONHOH + FP(O)(OR)_2 \rightarrow C_6H_5CONHOP(O)(OR)_2 + HF$$

$$C_6H_5CONHOP(O)(OR) \rightarrow C_6H_5NCO + HOP(O)(OR)_2$$

$$C_6H_5NCO + C_6H_5CONHOH \rightarrow C_6H_5CONHOCONHC_6H_5$$

$$2\ C_6H_5CONHOH + FP(O)(OR)_2 \rightarrow C_6H_5CONHOCONHC_6H_5 + HF + HOP(O)(OR)_2$$

Aufgrund dieser in der Literatur beschriebenen Reaktionsabläufe war es von Interesse, ob auch für den Umsatz zwischen o-Nitrophenylbutyrat und PAM stöchiometrische Beziehungen festzustellen waren.

Quantitative Untersuchungen:

Deswegen wurde zunächst der zeitliche Ablauf der Reaktion beobachtet. Hierzu wurden 5 ml Substrat-Phosphat-Puffer

und 1 mg PAM in 1 ml H_2O bei 25 ° C neben einem, anstelle der PAM-Lösung nur Wasser enthaltenden, Leerwert über verschiedene Zeiten inkubiert, sodann nach der Vorschrift von Main, Miles und Braid (41) mit Alkohol ad 10,0 ml aufgefüllt und spektrophotometrisch bei 414 mμ untersucht. Zu den verschiedenen Zeiten wurden die in Tabelle 31 aufgeführten Extinktionen gemessen.

Extinktion gemessen bei 414 mμ

bei 25 ° C inkubiert	Leerwert Substratpuffer + H_2O A	Ansatz (PAM + Substratpuffer) B	B - A
5 Min.	0,01	1,40	1,39
10 Min.	0,01	1,25	1,24
15 Min.	-,--	1,30	1,30
20 Min.	-,--	1,30	1,30
25 Min.	0,01	1,40	1,39
30 Min.	0,06	1,40	1,34
45 Min.	0,08	1,50	1,42
60 Min.	0,07	1,45	1,38
75 Min.	0,09	1,50	1,41
105 Min.	0,13	1,80	1,67
135 Min.	0,30	1,80	1,50
165 Min.	0,32	1,90	1,58
195 Min.	0,31	1,80	1,49

Tabelle 31: Substrat-Puffer: 5 ml
PAM: 1 mg in ml

Daraus ergibt sich, daß die Freisetzung von o-Nitrophenol durch die angewandte PAM-Menge (1 mg) praktisch sofort

eintritt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluß der PAM-Menge auf die in Freiheit gesetzte Menge an o-Nitrophenol untersucht.

Hierzu wurde wie soeben beschrieben vorgegangen mit dem Unterschied, daß außer 1,0 mg auch 0,8 mg, 0,6 mg und 0,4 mg PAM in 1 ml H_2O dem Substrat-Puffergemisch zugesetzt wurden. Bebrütungszeit bei 25 ° C 30 Minuten. Die bei den einzelnen Ansätzen gemessenen Extinktionen sind in Tabelle 32 abzulesen. Es ergibt sich eine Beziehung dergestalt, daß geringere PAM-Mengen auch geringere Mengen o-Nitrophenol in Freiheit setzen.

mg PAM in 1 ml	E 414 mμ	mg o-Nitrophenol
1,0	1,40	0,242
0,8	1,10	0,190
0,6	0,87	0,150
0,4	0,60	0,103
0,1	0,15	0,025

Tabelle 32: Substratpuffer: 5 ml
Bebrütung: 30 Min. bei 25 ° C

In weiteren Ansätzen wurde geprüft, ob bei geringeren PAM-Mengen die Zeit der Bebrütung bei 25 ° C einen Einfluß auf die Abspaltung von o-Nitrophenol hat; gemessen wurde jeweils die Extinktion nach 5, 10, 15,,20, 30 und 60 Minuten Bebrütungszeit. Es zeigte sich, wie schon in dem Versuch mit 1 mg PAM, daß Bebrütungszeiten über 5

Minuten keinen Einfluß auf das Versuchsergebnis haben.

Trägt man die im Versuchsansatz enthaltene Menge PAM gegen die in Freiheit gesetzte o-Nitrophenol-Menge in γ (berechnet nach der Eichkurve) auf, so ergibt sich die in Abbildung 19 wiedergegebene Gerade.

Die gefundene Gerade machte es wahrscheinlich, daß eine stöchiometrische Beziehung zwischen der PAM-Menge und dem abgespaltenen o-Nitrophenol besteht. Deswegen wurden die sich entsprechenden Mengen an PAM und o-Nitrophenol in MM umgerechnet (siehe Tabelle 33). Aus der Tabelle läßt sich ersehen, daß für alle durchgeführten Versuche auf ein Mol in Freiheit gesetztes o-Nitrophenol 2 Mol PAM kommen. Das sind Verhältnisse, die den von Hackley, Plapinger, Stollberg und Wagner-Jauregg (21) gefundenen sehr ähnlich sind.

Man kann daraus schließen, daß auch bei der Spaltung von o-Nitrophenylbutyrat PAM nicht als echter Katalysator wirkt, sondern bei der Reaktion verbraucht wird.

Durch PAM-Menge in mg	MM (A)	in Freiheit gesetztes o-Nitrophenol MM (B)	mg	Molverhältnis A/B
1,0	0,0038	0,00173	0,242	2,2
0,8	0,003	0,00137	0,190	2,2
0,6	0,0023	0,00117	0,150	1,98
0,4	0,0015	0,00076	0,103	1,98
0,1	0,0004	0,00018	0,025	2,2

Tabelle 33: Jeder Ansatz enthielt 0,015 MM o-Nitrophenylbutyrat (4 - 40 facher Überschuß).

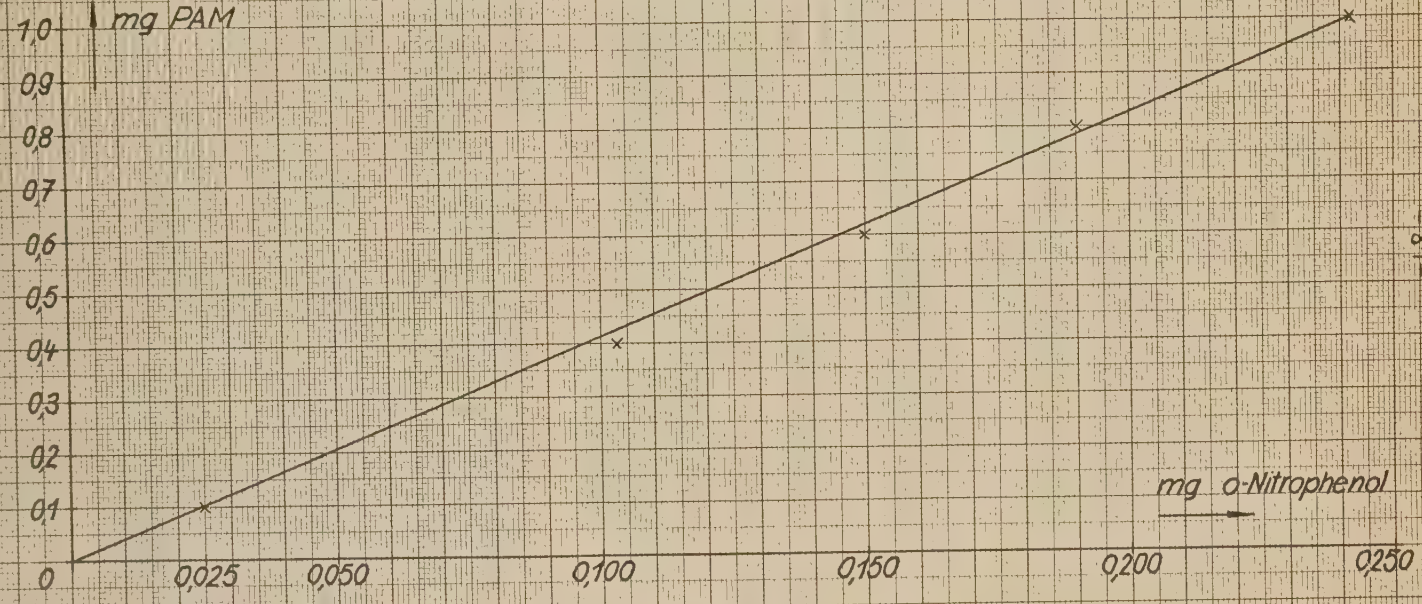

Durch verschiedene PAM - Mengen
aus o-Nitrophenylbutyrat
abgespaltenes o-Nitrophenol.
mg PAM
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0,025
0,050
0,100
0,150
0,200
0,250
mg o-Nitrophenol

Abb. 19

E) Diskussion

Die von Main, Miles und Braid (41) mitgeteilte Methode, mit o-Nitrophenylbutyrat die Aktivität der Cholinesterase im Blutserum zu bestimmen, wurde auf ihre Leistungsfähigkeit, insbesondere unter gerichtsmedizinischen Aspekten geprüft.

Die Werte bei frischen Nativ-Seren, die von 15 gesunden Personen im Alter von 20 - 45 Jahren gewonnen wurden, entsprechen den von den Autoren mitgeteilten Ergebnissen. Allerdings hat dies Verfahren eine gewisse Streubreite von $\pm$ 10 %. Dies dürfte jedoch auf den relativ großen Pipettierfehler beim Abmessen der kleinen Serummengen von 0,02 ml Serum zurückzuführen sein. Für die forensisch wichtige Frage, ob eine wesentliche Erniedrigung der Cholinesterase-Aktivität, etwa aufgrund einer Thiophosphatester-Vergiftung vorliegt, spielt diese Fehlerbreite jedoch keine bedeutende Rolle.

Auch am 2., 4.und 7. Tag nach Blutentnahme konnten noch den Anfangswerten gleichende Cholinesterase-Aktivitäten gemessen werden, so daß die Methode bis zu diesem Zeitpunkt als durchaus brauchbar gelten kann.

Ungenauer wurden die Ergebnisse vom 14. bis zum 28. Tag nach der Blutentnahme; teilweise ließ sich überhaupt keine Cholinesterase-Aktivität mehr nachweisen, teilweise waren die Abweichungen im Vergleich zum 1. Tag erheblich. In einigen Fällen jedoch lagen die Werte auch am 21. und 28. Tag dicht bei den Ausgangs-Aktivitäten. (Tab. 1 - 3). Dies dürfte an den Cholinesterasen selbst, nicht an der Methode liegen.

Sodann wurde der Einfluß von Anticoagulantien geprüft. In den Tabellen 4 - 22 sind die Abweichungen vom Nativ-Wert in %, jeweils für verschiedene Anticoagulans-Zusätze, mitgeteilt.

In dem mit Oxalat vermischten Blut ließen sich bis zum 4. Tag nach Blutentnahme gute Ergebnisse erzielen. Am 1. Tag lagen die Abweichungen in 67 % der Fälle zwischen 0 - 9 %. Am nächsten Tag wichen 53 % zwischen 10 - 19 % ab. Am 4. Tag lagen noch 40 % zwischen 0 - 9, und erst ab dem 7. Tag nach der Entnahme betrugen die Abweichungen über 30 %.

Bei dem Citrat-Plasma zeigten der 1. Tag mit 53 % und der 2. Tag mit 47 % zwischen 0 - 9 % Abweichung gute Beurteilungsmöglichkeiten der Cholinesterase-Aktivität. Am 4. Tag ergab sich keine eindeutige Änderung, am 7. Tag wichen 50 % zwischen 10 - 19 % ab, am 14. Tag und am 21. Tag je 50 % über 30 %. Am 28. Tag war keine Abweichung größer als 9 %.

Ungünstig waren, wie bereits zu erwarten, die Werte bei Fluorid-Zusatz, da Fluorid die Cholinesterase hemmt. Schon am 1. Tag wichen 50 % der Fälle zwischen 20 und 29 % vom Nativwert ab. Am nächsten Tag lagen 44 % über 30 %, am 4. und 7. Tag 66 % und 44 % zwischen 20 - 29 %. Die besten Ergebnisse wurden am 14. Tag nach Entnahme ermittelt, da hier 67 % der Fälle nur um 0 - 9 % abwichen. Der 21. Tag war dem 4. Tag zu vergleichen, am 28. Tag ließ sich keine deutlich überwiegende Abweichung finden.

Der Liquoid-Zusatz wirkte sich vom 1. bis zum 7. Tag nicht ungünstig aus, da die Abweichungen nur zwischen 0 - 9 %

lagen; 47 %, 53 %, 50 %, 40 %. In der zweiten Woche wich die eine Hälfte zwischen 0 - 9 %, die andere über 30 % ab. Am 21. Tag erreichten 100 % die geringste Abweichung von 0 - 9 %, am 28. Tag aber 66 % über 30 %.

Vetren ergab nur bis zum 4. Tag brauchbare Ergebnisse, wobei am 1. Tag 79 % um 0 - 9 %, am 2. Tag 50 % um 10 - 19 % und am 4. Tag 40 % um den gleichen Betrag abwichen. Am 7. Tag lagen je 30 % der Fälle bei Abweichungen von 0 - 9 % und 10 - 19 %, am 14. Tag je 50 % bei 10 - 19 % und über 30 %. Am 21. Tag wichen von 0 - 9 %, von 10 - 19 % und über 30 % je 33 % der Fälle ab. Am 28. Tag lagen 66 % der Fälle mit der Abweichung vom Nativwert über 30 %.

Abschließend läßt sich sagen, daß am 1. Tag Oxalat-, Citrat-, Liquoid- und Vetren-Zusatz die Cholinesterase-Aktivität im Serum nicht wesentlich beeinflussen. Gleiches gilt für den 2. Tag. Am 4. Tag erweisen sich noch Oxalat, Liquoid und Vetren als nicht wesentlich störend, am 7. Tag Citrat und Liquoid. Am 28. Tag nach Blutentnahme ließ nur das Citrat eine klare Aussage über die Cholinesterase-Aktivität zu (Tab. 23 - 29).

Die o-Nitrophenylbutyrat-Methode von Main, Miles und Braid (41) ist also im wesentlichen durchaus geeignet, um die Cholinesterase-Aktivität zu bestimmen. Sie ist relativ einfach und schnell durchführbar, und sie läßt sich auch nach Zusatz der Anticoagulantien Oxalat, Citrat, Liquoid und Vetren, ohne Fluorid, anwenden.

Es ist jedoch nicht möglich, eine Reaktivierung mit PAM durchzuführen, da bereits allein mit diesem Präparat eine

Spaltung des Substrates eintritt. Damit wird die Methode für die forensische Toxikologie nur bedingt brauchbar, da der Normalbereich der Cholinesterase-Aktivität stark streut und relativ geringe Exterase-Aktivitäten auch ohne Alkylphosphat-Vergiftungen auftreten können. Nur durch Reaktivierung ist eine klare Aussage darüber möglich, ob eine Vergiftung vorliegt oder nicht.

') Zusammenfassung

Es wurden zunächst verschiedene Methoden zur Cholinesterase-Aktivitätsbestimmung, aufgegliedert nach ihrem Arbeitsprinzip, mitgeteilt.

1962 gaben Main, Miles und Braid (41) eine neue, einfache und schnelle, spezifische Methode an. Sie bestimmen die Cholinesterase-Aktivität mit o-Nitrophenylbutyrat.

In eigenen Versuchen wurde zunächst geprüft, ob bei frischen Seren (von 15 Personen) ähnliche Werte erzielt werden konnten. Da dieses gelang, wurde anschließend bei denselben Personen über 28 Tage untersucht, ob sich diese Methode auch für Bestimmungen im Plasma mit Zusatz von Anticoagulantien verwenden läßt. Es zeigte sich, daß sowohl bei Zusatz der Anticoagulantien Oxalat, Citrat, Liquoid und Vetren als auch bei Untersuchungen längere Zeit nach der Blutentnahme noch sichere Aussagen über die Höhe der Cholinesterase-Aktivität gemacht werden können. Bis zum 4. Tag nach der Blutentnahme konnten bei einem Zusatz von Oxalat, Liquoid oder Vetren noch gute Ergebnisse erzielt werden, am 7. Tag.

solche von Citrat- oder Liquoid-Zusatz; am 28. Tag ließ nur das Citrat eine gute Aussage über die Esterase-Aktivität zu.

Für forensische Fragestellungen ist die Methode jedoch nur bedingt brauchbar, da eine Prüfung der Reaktivierbarkeit mit PAM, allein aufgrund der katalytischen Substrat-Hydrolyse schon durch PAM, nicht möglich ist.

G) Literaturverzeichnis

1 Ammon, R.: Die fermentative Spaltung des Acetylcholins. Pflügers Arch. Physiol. 233, 486 (1934)

2 Ammon, R. und F. J. Zapp: Eine einfache klin. chemische Methode zum Nachweis der Cholinesterase im Serum.
Klin. Wschr. 756 (1955)

3 Augustinsson, K.-B.: Cholinesterases, A study in comparative enzymology.
Acta Physiol. Scand. 15, Suppl. 52 (1948)

4 Cesaire, O. G.: Zit. Stumpf 1956.
Ann. biol. clin. 10, 84 (1952)

5 Davies, D. R. und J. D. Nicholls: Zit. Stumpf 1956.
Brit. Med. J. 1373 (1955)

6 Davies, D. R. und J. P. Rutland: The electrometric method of Michel for the estimation of cholinesterases.
Biochem. J. 47, XXII (1950)

7 Delaunois, A. L. und H. Casier: Zit. Stumpf 1956.
Arch. internat. pharmacodyn. thérap. 75, 371 (1948)

8 Drouet, P. L., M. Verain und Franquin: Zit. Stumpf 1956.
Bull. Acad. Méd. Paris III, 126, 412 (1942)

9 Edson, E. F., D. M. Sanderson, W. A. Watson and D. N. Noakes: The stability of blood cholinesterase after death.
Med. Sci. Law 2, 258 (1962)

10 Faber, M.: The relationship between Serum choline esterase and Serum albumin.
Acta med. Scand. 114, Fasc. I, 72 (1943)

11 Faber, M.: Serum choline esterase in patients with Proteinuria.
Acta med. Scand. 115, Fasc. V, 475 (1943)

12 Fleisher, J. H. und J. Pope: Colorimetric method for determination of red blood and cholinesterase activity in whole blood.
Arch. Industr. Hyg. 9, 323 (1954)

13 Friend, D. G. und O. Krayer: Zit. Stumpf 1956
Pharmacol. 71, 246 (1941)

14 Friedberg, K. D. und F. Sakai: Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Akylphosphaten (E 600, E 605, Systox) in Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines fermentaktivierenden Antidots (PAM).
Dtsch. Zeitschr. f. ger. Med. 47, 580 (1958)

15 Glick, D.: Zit. Stumpf 1956.
J.Gen.Physiol. 21, 289 (1938)

16 Glick, D.: Properties of cholinesterase in human serum.
Biochem. J. 31, 521 (1937)

17 Goldstein, A.: The mechanism of enzyme-inhibitor-substrate reactions. Illustrates by the cholin-esterase-physostigmin-acetyl-choline system.
J. Gen. Physiol. 27, 529 (1944)

18 Gomori, G.: Determination of phenol in biologic material.
J. Laborat. clin. med. 34, 275 (1949)

19 Green, A. L. and B. Saville: The reaction of oximes with iso-propyl-methyl phosphorrofluoridate (sarin).
Jor. chem. soc. 3887 (1956)

20 Gregoire, J. und M. Cotte: Zit. Stumpf 1956
Compt. rend. soc. biol. Paris 146, 741 (1952)

21 Hackley, B. E. jr., R. Plapinger, M. Stolberg and T. Wagner-Jauregg: Acceteration of the hydrolysis of organic fluorophosphates with hydroxamic acids.
J. Am. Chem. Soc. 77, 3651 (1955)

22 Hall, G. E. und G. G. Lucas: Zit. Stumpf 1956.
J. Pharmacol. 59, 34 (1957)

23 Hamblin, D. O. und H. F. Marchand: Cholinesterase tests and their applicability in the field.
New York American Cyanamid Comp., March 1951

24 Heinecker, R. und H. Losse: Cholinesterase-Aktivität des Serums und vegetative Tonuslage.
Klin. Wschr. 870 (1955)

25 Herzfeld, E. und Ch. Stumpf: Ein neuer Kurztest zur Bestimmung der Serumcholinesteraseaktivität.
Wien. klin. Wschr. 45, 874 (1955)

26 Hestrin, S.: The reaction of acethylcholine and other cabosylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application.
J. biol. chem. 180, 249 (1949)

27 De la Huerga, J., G. Yesinick und H. Popper: Zit. Stumpf 1956.
Amer. J. clin. Path. 22, 1126 (1952)

28 Huggins, C. und J. Lapides: Chromogenic substrates. IV. Acyl esters of p-Nitrophenol as substrates for the colorimetric determination of esterase.
J. biol. chem. 170, 467 (1947)

29 Jorpes, E.: Anticoagulantien.
Phys. Chemie. Ein Lehr- und Handbuch, Herausg. von Flaschenträger, B. und E. Lehnartz, Bd. II/1 a, 490 (1954)

30 Kalow, W.: Pharmacogenetics, Heredity and the Response to drugs.
W. B. Saunders Company. Philadelphia, London (1962)

31 Koelle, G. B.: Zit. Stumpf 1956.
J. Pharmacol. 100, 158 (1950)

32 Koelle, G. B. und J. S. Friedenwald: Zit. Stumpf 1956
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 70, 617 (1949)

33 Kommerell, S. und F. H. Frenken: Serumcholinesterase-Aktivität bei Leberkranken.
Dtsch. med. Wschr. 81, 1959 (1956)

34 Lang, W. und Intsesuloglu, G.: Zur Methodik und klinischen Bedeutung der Cholinesterasebestimmung im Serum.
Klin. Wschr. 40, 312 (1962)

35 Lidell, J., H. Lehmann and E. Silk: A "silent" pseudocholinesterase gene.
Nature 193, 561 (1962)

36 Limperos, G. und K. E. Ranta: A rapid screening test for the determination of the approximate cholinesterase activity of human blood.
Science 117, 453 (1953)

37 Lipmann, F. und L. C. Tuttle: A specific micromethod for the determination of Acyl Phosphates.
J. biol. chem. 159, 21 (1945)

38 Longo, V., F. Sorrentino und V. Colaciuri: Zit. Stumpf 1956
Med. sper. arch. ital. 7, 173 (1940)

39 Mac Donald, W. jr., C. B. Pollard und A. H. Gropp: A rapid mikromethod for electrometric determination of red cell cholinesterase activity in whole blood.
Arch. Industr. Hyg. 6, 271 (1952)

40 Maier, E. H.: Serumcholinesterase und Lebererkrankungen.
Dtsch. med. Wschr. 81, 1674 (1966)

41 Main, A. R., K. E. Miles und P. E. Braid: The determination of human serum - cholinesterase activity with o-nitrophenyl butyrate.
Biochem. J. 78, 769 (1961)

42 Meyer, A. und W. Wilbrandt: Zur Bestimmung der Aktivität der Cholinesterase im menschlichen Blute. Helv. physiol. pharmacol. acta 12, 206 (1954)

43 Michel, H. O.: An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity.
J. Laborat. clin. Med. 34, 1564 (1949)

44 Morand, P. und H. Laborit: Zit. Stumpf 1956
Presse méd. 131 (1947)

45 Nachmansohn, D. und E. C. Lederer: Zit. Stumpf 1956.
Compt. rend. soc. biol. Paris, 130, 321 (1939) und 1065.

46 Pietschmann: Unterschiede der Aktivitäten von Serum-Cholinesterase und Serumglutaminsäure-Oxalessigsäure-Transaminase bei Erkrankungen der Leber.
Wiener Ztschr. inn. Med. 41, 409 (1960)

47 Pighini, G.: Zit. Stumpf 1956.
Biochem. terap. sper. 26, 157 (1939)

48 Pilz, W.: Die photometrische Mikrobestimmung der Acetylcholinesterase in Serum und Erythrocyten.
Klin. Wschr. 21, 1017 (1958)

49 Pribilla, O.: Die Bestimmung der Serumcholinesterase an der Leiche.
Dtsch. Zeitschr. f. d. ges. gerichtl. Med. 46, 79 (1957/58)

50 Ravin, H. A., K. G. Tsou und A. M. Seligman: Colorimetric estimation and histochemical demonstration of serum cholinesterase.
J. biol. Chem. 191, 843 (1951)

51 Reinhold, J. G., L. G. Tourigny und V. L. Yonan: Zit. Stumpf 1956.
Amer. J. clin. Path., 23, 645 (1953)

52 Rider, J. A., H. G. Moeller und K. P. Du Bois: Zit. Stumpf 1956.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 76, 427 (1951)

53 Rinkel, M. und M. Pijoan: Zit. Stumpf 1956
J. Pharmacol. 64, 228 (1938)

54 Sanz, M.: Zit. Stumpf 1956.
Helv. physiol. pharmacol. acta 2, 29 C (1944)

55 Stedman, E. und E. Stedman: Zit. Stumpf 1956
Biochem. J. 29, 2107 (1935)

56 Stedman, E., E. Stedman und L. H. Easson: Zit. Stumpf 1956.
Biochem. J. 26, 2056 (1932)

57 Stedman, E., E. Stedman und A. C. White: Zit. Stumpf 1956
Biochem. J. 27, 1055 (1933)

58 Stefenelli, N.: Die Korrelation zwischen dem Albumingehalt und der Cholinesteraseaktivität des Blutserums und ihre Beurteilung bei Albuminverlust.
Klin. Wschr. 19, 1019 (1961)

59 Stumpf, Ch.: Methoden zur Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität im Blut.
Ztschr. Vitamin-, Horm.-, Ferment-Forschg. 8, 36 (1956)

60 Tammelin, L. E.: An electrometric method for the determination of cholinesterase-activity.
Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 5, 267 (1953)

61 Tammelin, L. E. und H. Löw: Zit. Stumpf 1956
Acta chem. Scand. 5, 322 (1951)

62 Tammelin, L. E. und B. Strindberg: Zit. Stumpf 1956
Acta chem. Scand. 6, 1041 (1952)

63 Wagner-Jauregg, T. and B. E. Hackley jr.: Model reactions of phosphorus-containing enzyme inactivators. III. Interaction of imidazole, Pyridine and some of their derivatives with Dialkyl-halogenophosphates.
J. Am. chem. Soc. Vol. LXXV, April - June 1953, p. 2125, 2126 and 2127

64 Willstätter, R., R. Kuhn, O. Lind und F. Memmen: Zit. Stumpf 1956.
Ztschr. Physiol. Chem. 167, 303 (1927)

65 Wilson, J. B., S. Ginsburg and E. K. Meislich: The reactivation of acetylcholinesterase and diisopropylfluorophosphate.
J. Amer. chem. Soc. 77, 4286 (1955)

66 Wolfsie, J. H. und G. D. Winter: Statistical analysis of normal human red blood cell und plasma cholinesterase activity values.
Arch. Indust. Hyg. 6, 43 (1952)

67 Wolfsie, J. H. und G. D. Winter: Bromothymol blue screening test. Values for determination of blood cholinesterase activity. Arch. Industr. Hyg. 9, 396 (1954)

68 Woolf, L. J.: Gene expression in heterocygotes. Nature, 194, 609 (1962)

Herrn Professor Dr. Dr. Weinig danke ich sehr für die Überlassung des Themas und für den Arbeitsplatz in seinem Institut.

Sehr herzlich danke ich Frau Dr. Dr. Geldmacher-v. Mallinckrodt für ihre außergewöhnlich große Hilfsbereitschaft und den zu jeder Zeit so freundlich erteilten Rat, die mir die Fertigstellung dieser Arbeit ganz wesentlich erleichterten.

Lebenslauf

Ich wurde am 21. 9. 1930 als Tochter des Chemikers Dr. Eduard Kaiser und seiner Ehefrau Anna, geb. Schirmer, in Hannover geboren.
Nach dem Besuch der Volksschule in Hannover und Kempten/Allg. war ich von 1941 bis zur 1950 bestandenen Reifeprüfung Schülerin der Städt. Mädchenoberrealschule in Kempten.
In Düsseldorf begann 1951 meine Lehrzeit als Töpferin, die ich 1953 in Nürnberg mit der Gesellenprüfung beendete. Anschließend arbeitete ich in einem Keramischen Betrieb in Pfronten/Allg. bis April 1955.
Mit dem Medizin-Studium begann ich im Mai 1955 in Freiburg im Breisgau; 1956 wechselte ich nach Erlangen über, bis ich hier im Oktober 1957 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Seit November 1957 studierte ich wieder in Freiburg. Dort bestand ich im Juni 1961 das Medizinische Staatsexamen.
Im Kreiskrankenhaus Roth/Nürnberg habe ich zunächst ein Jahr meiner Medizinalassistentenzeit abgeleistet. Im Oktober 1962 wurde mir im Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität Erlangen-Nürnberg die Möglichkeit zur Promotion gegeben. Nach Beendigung des experimentellen Teiles dieser Arbeit war ich kurze Zeit Medizinalassistentin an der Erlanger Universitäts-Frauenklinik. Danach kehrte ich an das Kreiskrankenhaus Roth/Nürnberg zurück. Im Oktober 1963 erhielt ich die Approbation.

Erlangen, Dezember 1964

Buchdruck und Fotodruck: Ludwig Müller, Erlangen, Fahrstraße 5